

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

KATEDRA BIOCHEMIE



**Studium inkorporace modifikovaných
aminokyselin do cytochromu b₅**

**Study of modified amino acids incorporation
into cytochrome b₅**

Bakalářská práce

Monika Koberová

Školitel: Prof. RNDr. Petr Hodek, CSc.

Praha 2010

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod odborným vedením Prof. RNDr. Petra Hodka, CSc. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

V Praze dne

.....

Monika Koberová

Poděkování

Chtěla bych poděkovat především svému školiteli Prof. RNDr. Petru Hodkovi, CSc. za obětavé vedení této bakalářské práce, cenné rady a pomoc při jejím vypracovávání.

Dále děkuji RNDr. Věře Kotrbové, Ph.D. za objasnění metodických postupů, všestrannou pomoc a za vytvoření příjemné pracovní atmosféry. A RNDr. Miroslavu Šulcovi, PhD. za provedené hmotnostní analýzy.

Abstrakt

Cytochrom b_5 (cyt b_5) může ovlivňovat reakce katalyzované cytochromy P450, a v důsledku toho se může podílet i na aktivaci látek (například léčiv, karcinogenů) případně ovlivňovat poměry vzniklých metabolitů. Mechanismu působení cyt b_5 ještě nebyl zcela objasněn. Přínosem k objasnění mechanismu by mohlo být zjištění protein-proteinových interakcí v monooxygenasovém systému, kterého je tento protein součástí. Pro studium těchto interakcí pomocí síťovacích technik je vhodné připravit fotolabilní cyt b_5 , který by se po fotoaktivaci stal vysoce reaktivním a vytvořil by komplex s nejbližšími složkami v monooxygenasovém systému. Tato práce se zabývá vypracováním metody pro produkci rekombinantního cyt b_5 s modifikovanými aminokyselinami. Cyt b_5 byl exprimován v bakteriálním kmeni *E.coli* BL-21 (DE3) Gold. Před indukcí exprese byly bakterie převedeny do limitního media (DMEM-LM), které neobsahovalo L-leucin a L-methionin. Limitní mediu bylo doplněno modelovou deuterovanou aminokyselinou d_3 -methyl-L-methioninem a D,L-leucinem. Exprimovaný cyt b_5 byl izolován a inkorporace d_3 -methyl-methioninu byla ověřena hmotnostní spektrometrií. V úvodních experimentech byl cyt b_5 získán převážně jako apoprotein (apo-cyt b_5). Pro zvýšení inkorporace hemu do apo-cyt b_5 byl studován vliv teploty na inkorporaci hemu při produkci proteinu. Snížením teploty z 37 °C na 27 °C se inkorporace hemu zvýšila o 25 %. Protože byla inkorporace hemu stále nízká, byl apo-cyt b_5 rekonstituován s hemem.

Klíčová slova:

cytochrom b_5 , cytochrom P450, exprese proteinu, izolace cytochromu b_5 , fotolabilní aminokyseliny, protein-proteinové interakce, xenobiotika

Abstract

A cytochrome b_5 (cyt b_5) can influence cytochrome P450 (CYP)-dependent reactions. In consequence of these reactions cytochrome b_5 can participate in substance activation (for example drugs, carcinogens) or it can influence proportions of formed metabolites. A mechanism of cyt b_5 action has not been fully explained yet. Elucidation of protein-protein interactions in monooxygenase system could explain of the mechanism of cyt b_5 action. To study these interactions by using cross-linking techniques is necessary to prepare photolabile cyt b_5 , which after photoactivation generated highly reactive intermediates which can create a complex with nearby components of the monooxygenase system. This thesis describes how was developed the method for the production of recombinant cyt b_5 with modified amino acids. Cyt b_5 was expressed in a bacterial strain *E. coli* BL-21 (DE3) Gold. Before the expression induction, cells were transformed into the limiting medium (DMEM-LM) which did not contain L-leucine and L-methionine. The limiting medium was supplemented by deuterated amino acid d_3 -methyl-L-methionine and D,L-Leucine. Expressed cyt b_5 was isolated and incorporation of d_3 -methyl-L-methionine has been verified by mass spectrometry. Cyt b_5 was obtained mainly as the apoprotein (apo-cyt b_5). That is why in this thesis there was studied a temperature influence on haem incorporation into the apo-cyt b_5 . When temperature decreased from 37 °C to 27 °C, the incorporation of haem increased by 25 %. As the incorporation of haem was low the reconstitution of apo-cyt b_5 with haem was undertaken.

Keywords:

cytochrome b_5 , cytochrome P450, protein expression, isolation of cytochrome b_5 , photolabile amino acids, protein-protein interactions, xenobiotics

Obsah

Obsah	6
Seznam použitých zkratk	8
1. Úvod.....	10
1.1. Monooxygenasový systém (MFO systém).....	10
1.1.1. Cytochromy P450	11
1.1.1.1. Reakční cyklus cytochromu P450.....	13
1.1.2. NADPH:cytochrom P450 reduktasa.....	14
1.2. Cytochrom b ₅	16
1.2.1. Funkce cytochromu b ₅	16
1.2.2. Struktura cytochromu b ₅	17
1.2.3. Mechanismus působení cytochromu b ₅	18
1.2.3.1 Urychlení vkládání druhého elektronu	18
1.2.3.2 Posílení spojení komplexu se superoxidovým anionradikálem	19
1.2.3.3 Vytvoření dvouelektronového akceptorového komplexu.....	19
1.2.3.4. Ovlivnění struktury navázáním cytochromu b ₅	19
1.3. Vztah struktury a funkce složek MFO	20
1.3.1. Protein-proteinové interakce v MFO systému.....	20
1.3.1.1. Interakce proteinů s membránou.....	20
1.3.1.2. Interakce mezi cytochromem P450 a NADPH:cytochrom P450 reduktasou	22
1.3.1.3. Interakce mezi cytochromem b ₅ a NADH:cytochrom b ₅ reduktasou	23
1.3.1.4. Interakce mezi cytochromem P450 a cytochromem b ₅	24
1.3.1.5. Interakce mezi cytochromy P450	25
1.3.2. Metody pro zjišťování protein-proteinových interakcí	25
1.3.2.1. Síťovací techniky	25
1.3.2.1.1. Síťovací činidla	26
1.3.2.2. Příprava a použití fotoaktivovatelných proteinů.....	27
2. Cíl bakalářské práce.....	29
3. Materiál a metody	30
3.1. Použitý materiál a chemikálie	30
3.2. Použité přístroje	31
3.3. Analytické metody	32

3.3.1. Stanovení koncentrace proteinů	32
3.3.2. Spektrofotometrická charakterizace finálního preparátu cytochromu b ₅	33
3.3.2.1. Stanovení koncentrace cyt b ₅ z absolutního spektra	33
3.3.2.2. Stanovení cytochromu b ₅ z diferenčního spektra	34
3.4. Inkorporace hemu do apo-cytochromu b ₅	34
3.5. SDS elektroforesa na polyakrylamidovém gelu	35
3.5.1. Příprava polyakrylamidového gelu	35
3.5.2. Příprava vzorků	35
3.5.3. Průběh elektroforesy	36
3.6. Příprava a izolace rekombinantního cytochromu b ₅	36
3.6.1. Transformace kompetentních buněk	36
3.6.2. Kultivace bakterií a produkce cytochromu b ₅	37
3.6.2.1 Produkce cytochromu b ₅ v LB mediu při 37 °C	37
3.6.2.2. Porovnání produkce cytochromu b ₅ v odlišných mediích	37
3.6.2.3. Studium inkorporace hemu při produkci cytochromu b ₅	38
3.6.3. Izolace cytochromu b ₅ z bakteriálních buněk	38
3.6.3.1. Izolace membránové frakce	38
3.6.3.2. Solubilizace cytochromu b ₅ z membrán	39
3.6.3.3. Chromatografie na koloně DEAE-Sepharosy CL6B	39
4. Výsledky	41
4.1. Optimalizace produkce cytochromu b ₅	41
4.2. Izolace cytochromu b ₅	43
4.2.1. Solubilizace cytochromu b ₅	43
4.2.2. Chromatografie na koloně DEAE-Sepharosy CL6B	44
4.2.3. Charakterizace finálních preparátů cytochromu b ₅	50
4.2.3.1. Stanovení koncentrace proteinů	50
4.2.3.2. Spektrofotometrická charakterizace cytochromu b ₅	51
4.3. Inkorporace modifikované aminokyseliny do cyt b ₅	51
4.4. Studium inkorporace hemu při produkci cytochromu b ₅	53
4.5. Rekonstituce apo-cytochromu b ₅ s hemem	55
5. Diskuse	56
6. Shrnutí a závěr	58
Seznam použité literatury	59

Seznam použitých zkratek

aaRSs	aminoacyl-tRNA synthetasy
AMK	aminokyselina
Amp	ampicilin
Arg	arginin
Asp	asparagová kyselina
A_x	absorbance při vlnové délce x nm
BCA	4,4'-dikarboxy-2,2'-bicinchoninová kyselina
BIS	N,N-methylen-bis-akrylamid
BSA	hovězí sérový albumin
c	molární koncentrace
CBB	Coomassie Brilliant Blue
c_m	hmotnostní koncentrace
cyt b₅	cytochrom b ₅
CYP	cytochrom P450
Da	dalton
DEAE-Sepharosa CL6B	diethylaminoethyl-Sepharosa CL6B
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMEM-LM	Dulbecco's Modified Eagle's Limiting Medium
EDTANa₂	disodná sůl ethylendiamintetraoctové kyseliny
FAD	flavinadenindinukleotid (chinoidní forma)
/FADH/FADH₂	/semichinoidní radikál/hydrochinon
FMN	flavinadeninmononukleotid (chinoidní forma)
/FMNH/FMNH₂	/semichinoidní radikál/hydrochinon
Glu	glutamová kyselina
His	histidin
IPTG	isopropylthio-β-D-galaktopyranosid

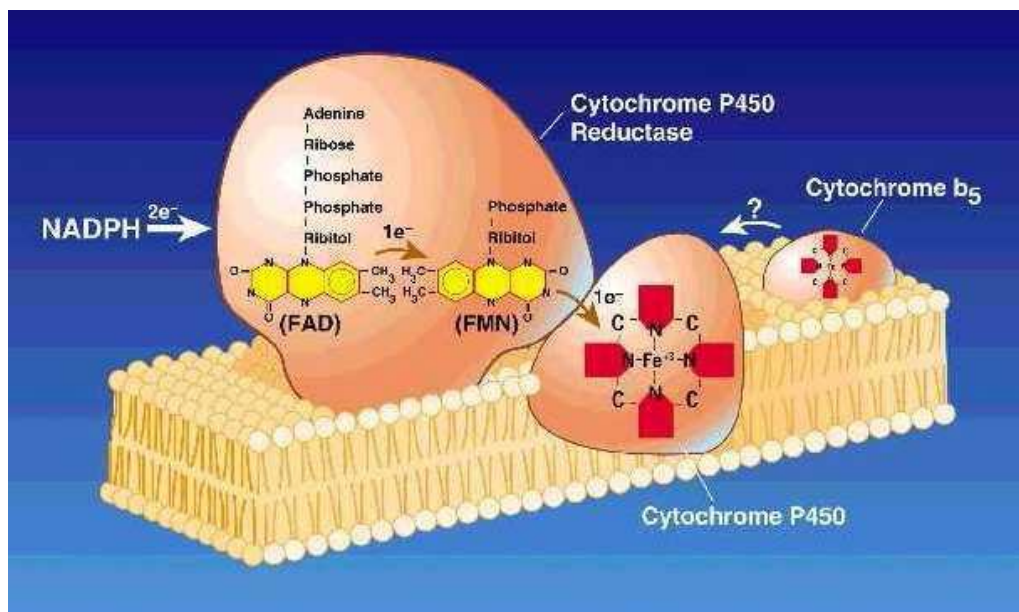
k_{cat}	katalytická konstanta
K_M	konstanta Michaelis-Mentenové
l	optická dráha
LB medium	Luria Broth medium
Lys	lysin
M	mol/l
MetRS	methionin-tRNA synthetasa
MFO	system oxidas a oxygenas se smíšenou funkcí (mixed function oxidases)
M_r	relativní molekulová hmotnost
NAD(P)⁺	nikotinamidadenindinukleotid(fosfát) oxidovaný
NAD(P)H	nikotinamidadenindinukleotid(fosfát) redukovaný
NMR	nukleární magnetická rezonance
Pro	prolin
RH	substrát
ROH	hydroxylovaný produkt
SDS	dodecylsulfát sodný
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
TRIS	tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	transferová ribonukleová kyselina
UV	ultrafialové záření
v/v	objem/objem
VIS	viditelné záření
w/v	hmotnost/objem
ϵ_x	absorpční molární koeficient při vlnové délce x nm
δ-ALA	δ -aminolevulová kyselina
λ	vlnová délka

1. Úvod

Cytochromy P450 jsou enzymy, které hrají rozhodující roli v metabolismu xenobiotik. Jako xenobiotika se označují látky, které se v organismu normálně nevyskytují a nejsou nezbytné pro jeho zdravý vývoj a ani pro něj neslouží jako zdroj energie¹. Jsou přijímány buď nezáměrně v potravě či z prostředí, nebo záměrně jako například léčiva. Značný počet studií sleduje účinnost cytochromů P450 v metabolismu léčiv. A to jak jejich podíl na tvorbě finálních metabolitů léčiv, které jsou z těla snadno vylučovány, tak i na reakcích vedoucích ke zvýšení jejich farmakologické aktivity nebo vyvolávajících toxické efekty². Cytochromy P450 nefungují samostatně, pro svou funkci potřebují ještě další složky. Velmi důležitou složkou je cytochrom b₅. V posledních letech je cytochrom b₅ zkoumán právě v souvislosti s metabolismem léčiv a jiných xenobiotik. Bylo prokázáno, že cytochrom b₅ může ovlivňovat reakce katalyzované cytochromy P450, a v důsledku toho se může podílet i na aktivaci látek nebo může ovlivňovat poměry vzniklých metabolitů. Z farmakologického hlediska je důležité vědět, jestli vznikne aktivovaná forma léčiva, nebo naopak dojde k přeměně látky na neúčinnou formu, nebo dokonce k přeměně na potenciální karcinogenní látku. Abychom mohli předpovědět, co se s léčivem nebo jinou chemickou sloučeninou stane, je třeba znát všechny mechanismy probíhající v monooxygenasovém systému. Mechanismus působení cytochromu b₅ ještě nebyl zcela objasněn a vzniká tak prostor pro další studie. Přínosem k objasnění mechanismu může být zjištění protein-proteinových interakcí v monooxygenasovém systému.

1.1. Monooxygenasový systém (MFO systém)

Monooxygenasový systém, též nazýván jako systém oxidas a oxygenas se smíšenou funkcí (MFO systém z angl. “mixed function oxidases”), je systém enzymů vázaných v membráně hladkého endoplazmatického retikula nebo mitochondrií. Tento enzymový systém katalyzuje inkorporaci jednoho atomu kyslíku do molekuly substrátu a druhý atom kyslíku je redukován na vodu. Skládá se ze tří základních složek, **cytochromu P450**, **NADPH: cytochrom P450 reduktasy** a **membrány** endoplazmatického retikula či mitochondrie (obr. 1, str. 11). Dále jsou k němu přiřazovány NADH:cytochrom b₅ reduktasu a cytochrom b₅³.



Obr. 1. Teoretické uspořádání MFO systému v membráně

Cytochrom P450 slouží jako terminální oxidasa, NADPH:cytochrom P450 reduktasa přenáší elektrony na cytochrom P450 a redukuje tak jeho centrální atom železa v hemu.

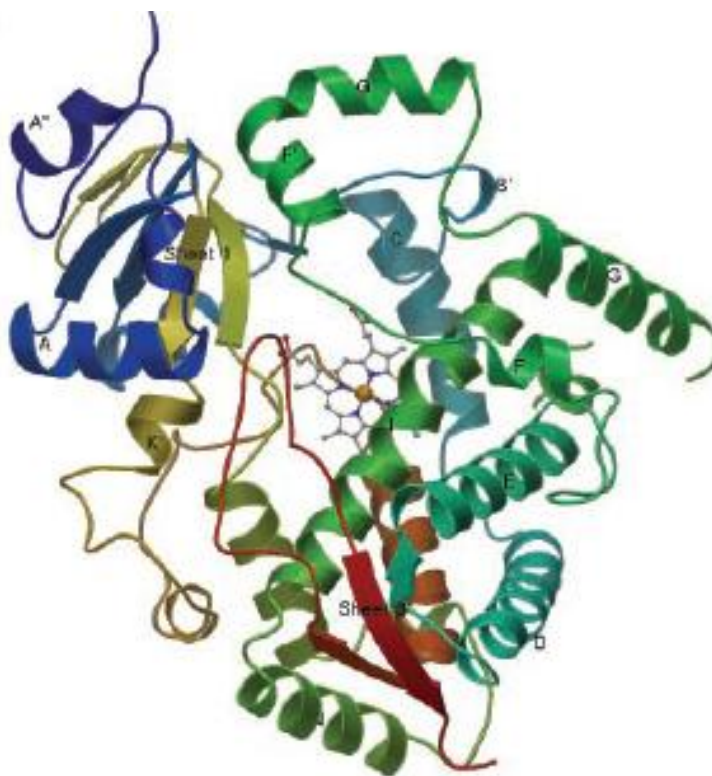
1.1.1. Cytochromy P450

Klingenberg⁴ a Garfinkel⁵ objevili v roce 1958 nový mikrosomální pigment, který je po redukcí schopný vázat oxid uhelnatý. Tento komplex s navázaným oxidem uhelnatým se vyznačuje absorpčním maximem při 450 nm. O pár let později Omura a Sato⁶ dokázali, že neznámý pigment je hemoprotein a pojmenovali ho cytochrom P450. V roce 1964 byl izolován z králíčích jater⁷.

Cytochromy P450 jsou v organismech především zodpovědné za reakce I. fáze biotransformace, které se podílí na detoxikaci chemických sloučenin. Katalyzují oxidační, peroxidační a redukční reakce, které jsou součástí různých metabolických drah xenobiotik a endogenních látek². Kromě detoxikace se mohou podílet i na bioaktivaci, kdy jsou neškodné látky metabolicky přeměněny na látky, které mohou být toxické nebo karcinogenní⁸.

Schopnost všech cytochromů P450 aktivovat molekulární kyslík souvisí se způsobem vazby, kterým je protoporfirin IX vázán k apoproteinu. Protoporfirin IX je k proteinové molekule vázán jak hydrofobně, tak prostřednictvím thiolátové síry

sulfhydrylové skupiny cysteinu přítomné v aktivním centru enzymu. Tento typ vazby dává porfirinovému skeletu schopnost zprostředkovat přenos elektronové hustoty ⁹. Molekulové hmotnosti jednotlivých cytochromů P450 se pohybují kolem hodnoty 50 000 Da ¹⁰ a apoproteinová část obsahuje přibližně 500 aminokyselinových zbytků ¹¹. Primární struktury cytochromů P450 se často výrazně liší, ale sekundární a terciární struktury bývají podobné (obr. 2.)

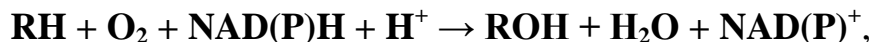


Obr. 2. Cytochrom P450 3A4

Cytochromy P450 patří mezi enzymy se širokou substrátovou specifitou. Metabolizují jak endogenní látky (např. steroidy, nasycené a nenasycené mastné kyseliny, prostaglandiny, vitaminy atd.), tak xenobiotika (např. léčiva, potravinová aditiva, průmyslové exhaláty, kontaminanty životního prostředí) ^{1,2,12}. Metabolizují látky s malou molekulovou hmotností jako je třeba methanol ($M_r = 42$), ale i látky jako imunosupresivní léčivo cyklosporin ($M_r = 1203$) ⁸. Obecně lze říci, že substráty jsou látky hydrofobní ², ale lze nalézt i cytochromy P450, které metabolizují i polární látky jako jsou ethanol a aceton. Takovýmto příkladem je cytochrom 2E1 ⁹.

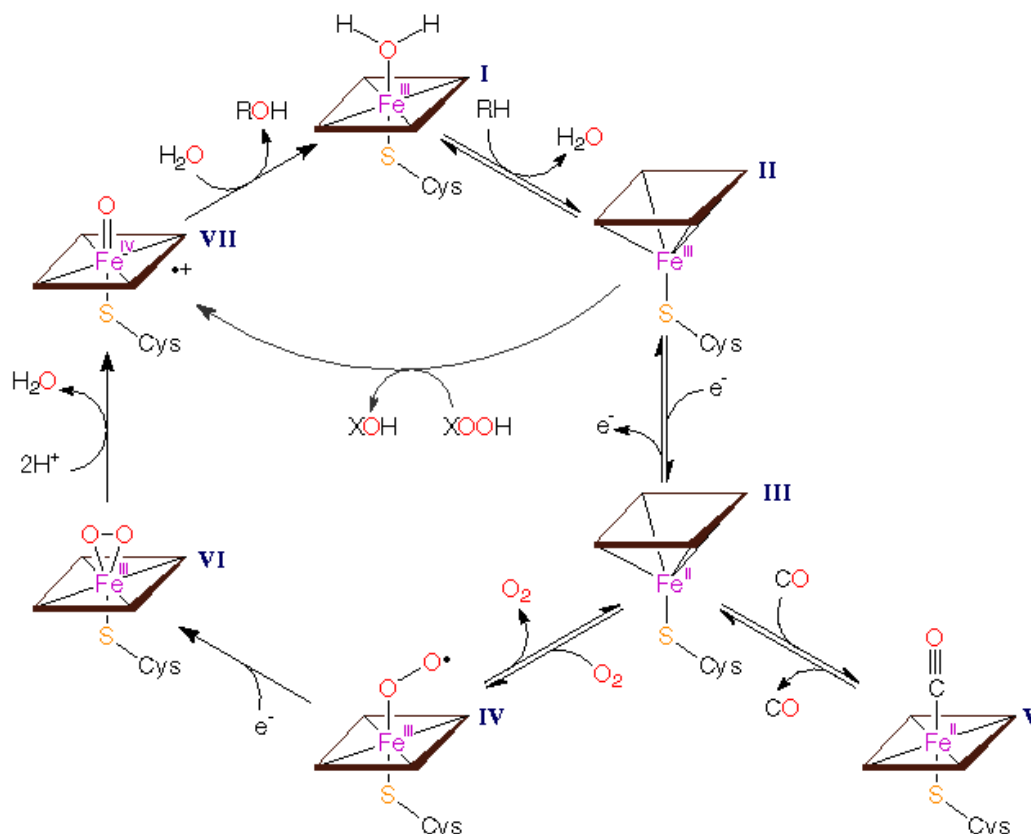
1.1.1.1. Reakční cyklus cytochromu P450

Typická reakce katalyzovaná cytochromem P450 je monooxygenasová reakce, kterou lze obecně vyjádřit rovnicí:



kde RH představuje substrát a ROH hydroxylovaný produkt reakce. Reakční cyklus probíhá uspořádaným mechanismem a pravděpodobně se skládá až z osmi kroků^{2,10}. Reakční cyklus začíná přenosem elektronů z NADPH na NADPH:cytochrom P450 reduktasu v endoplazmatickém retikulu nebo na ferredoxin reduktasu a nehemový Fe-S protein v mitochondriích, a poté na cytochromy P450. Redukovaný cytochrom P450 pak naváže a aktivuje molekulu kyslíku, z které je jeden atom inkorporován do molekuly substrátu a druhý vytvoří molekulu vody¹³. Schéma reakčního cyklu je uvedeno na obr. 3, str. 14. V klidovém stavu obsahuje hem atom železa v oxidovaném stavu (Fe^{3+}) a je hexakoordinován (nízkospinový stav), šestá valence je obsazena atomem kyslíku z molekuly vody nebo inertním (aminokyselinovým) ligandem (**I**). Po navázání substrátu (RH) do aktivního centra enzymu dochází k “vytlačení” šestého ligandu atomu železa. Atom železa po ztrátě jednoho ligandu zůstane pentakoordinován (vysokospinový stav) a zároveň v molekule enzymu nastane konformační změna (**II**). Navázáním substrátu je umožněna jedoelektronová redukce cytochromu P450 interakcí s NADPH:cytochrom P450 reduktasou, čímž se atom železa v oxidovaném stavu Fe^{3+} redukuje na Fe^{2+} a přetrvává v pentakoordinovaném stavu. Tato forma enzymu je pak schopná vázat molekulu kyslíku nebo jiné ligandy, např. CO (**III**) a (**V**). Navázáním biatomické molekuly kyslíku vzniká ternární ferri-superoxidový komplex, kde je atom železa znovu hexakoordinován. Tento komplex není příliš stabilní a je dále redukován NADPH:cytochrom P450 reduktasou nebo NADH:cytochrom b_5 reduktasou, čímž dochází k aktivaci na peroxidový anion (**IV**). Komplex cytochromu P450 s biatomickou molekulou kyslíku je po druhé redukci již zcela aktivovanou formou cytochromu P450, ve které dochází ke štěpení vazby O-O, přičemž jeden atom kyslíku je redukován, přijme dva protony a dojde k uvolnění vody (**VI**). Druhý atom kyslíku zůstane vázán na iontu železa v hemu ve formě ferrioxenového komplexu (**VII**), který je stabilizován mezomerním posunem elektronu z thiolátové síry na kyslík. Vzniklý reaktivní kyslíkový radikál je schopen vytrhnout vodíkový atom z molekuly vhodného substrátu za vzniku radikálu

a hydroxylového radikálu vázaného na iont železa hemu. Po rekombinaci radikálů se uvolňuje hydroxylovaná forma substrátu (ROH) a cytochromu P450 v původním stavu^{10,13}.



Obr. 3. Reakční cyklus cytochromu P450¹⁴. RH – substrát, ROH – hydroxylovaný produkt, XO₂H – peroxisloučenina (alternativní donor kyslíku), Fe – atom hemového železa enzymu

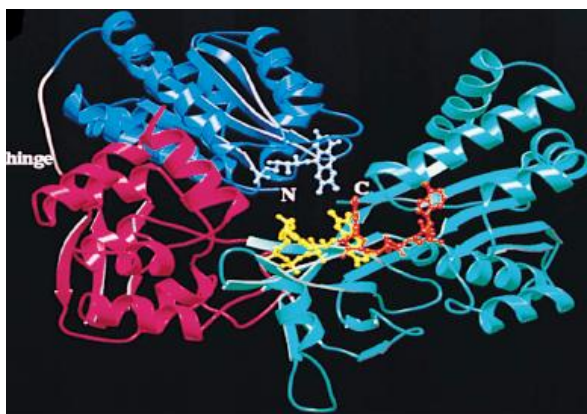
Kromě kyslíku může cytochrom P450 pro oxidační reakce využívat peroxidy a peroxikyseliny, které se stávají donorem již aktivovaného atomu kyslíku. Z komplexu (III) může přímo vznikat komplex (VII). Tato reakce bývá označována jako **peroxidasová aktivita cytochromu P450**, probíhá neuspořádaným mechanismem a vazba peroxidu není závislá na vazbě substrátu^{2,10,13}.

1.1.2. NADPH:cytochrom P450 reduktasa

NADPH:cytochrom P450 reduktasa je membránový protein, který katalyzuje elektronový přenos z NADPH na cytochromy P450¹⁵. Jeho výjimečnost u mikrosomálního

systemu cytochromu P450 spočívá v tom, že zároveň obsahuje **FMN** a **FAD** koenzymy. Současná přítomnost těchto dvou koenzymů umožňuje redukovat cytochrom P450 v sekvenčně oddělených krocích a působit tak jako dělič elektronového páru pro přenos na cytochrom P450. Dalšími akceptory elektronu mohou být: cytochrom b_5 , cytochrom c , hemová oxygenasa a další látky ¹⁰.

NADPH:cytochrom P450 reduktasa má dvě funkční domény, hydrofobní N-terminální doménu (6 kDa) a hydrofilní C-terminální katalytickou doménu (72 kDa). N-terminální doména slouží k ukotvení enzymu do membrány, čímž zajišťuje správnou prostorovou orientaci pro elektronový přenos. Strukturně se dá molekula reduktasy rozdělit na čtyři domény: FMN-vazebnou doménu, spojovací doménu, a FAD- a NADPH-vazebnou doménu ¹⁵ (obr. 4).

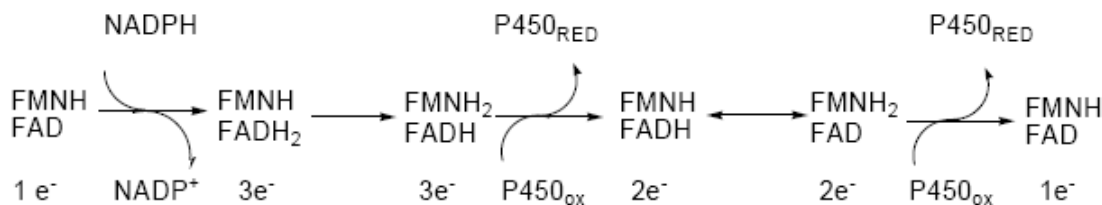


Obr. 4. Struktura NADPH:cytochrom P450 reduktasy. FMN-vazebná doména je znázorněna tmavě modře, spojovací doména červeně, a FAD- A NADPH-vazebná doména světle modře ¹⁵

C-terminální funkční doména se skládá z FMA a FAD-vazebné domény, které jsou propojeny spojovací doménou. Spojovací doména zodpovídá za správnou prostorovou orientaci obou strukturních domén. FAD a FMN se vzájemně nepřekrývají, jsou v kontaktu prostřednictvím 7- a 8-methylových skupin isoalloxazinových kruhů flavinů. Toto uspořádání indikuje, že přenos elektronů mezi flaviny není zprostředkován aminokyselinovými zbytky, ale je přímý, a proto je tento přenos poměrně rychlý ^{10,15}.

Funkce NADPH:cytochrom P450 reduktasy jako děliče elektronové páru byla vysvětlena na základě rozdílných redoxních potenciálů flavinových koenzymů ^{16,17}.

Akceptorem elektronů (resp. atomů vodíku) od NADPH je FAD, který elektrony předává FMN. Za jedoelektronovou redukci cytochromu P450 je zodpovědný zcela redukovaný hydrochinon FMNH₂ (obr. 5).



Obr. 5. Schéma přenosů elektronů mezi flavinovými koenzymy FAD a FMN¹⁰

1.2. Cytochrom b₅

Cytochrom b₅ (cyt b₅) je membránově vázaný hemoprotein s molekulovou hmotností kolem 17 000 Da^{18,19}, který je schopný přijímat a přenášet elektrony²⁰. Cytochrom b₅ se během evoluce objevil již velmi brzy a vyskytuje se u živočichů, rostlin i hub²¹. Primární struktura cyt b₅ je vysoce konzervovaná. Cytosolická doména vázající hem je nejvíce konzervovaným úsekem, králičí cyt b₅ sdílí 74-95 % sekvenční homologie s obratlovci a 40-59 % s rostlinami a bezobratlými živočichy²². Ale struktura C-terminální domény vykazuje už poněkud nižší sekvenční homologii.

U savců existují tři izoformy cytochromu b₅, dvě izoformy jsou membránově vázané a jedna forma je volně rozpustná. Membránově vázané formy se vyskytují na vnější straně membrány endoplasmatického retikula a na vnější membráně mitochondrií. Volně rozpustná forma se nalézá v cytoplazmě červených krvinek²¹.

1.2.1. Funkce cytochromu b₅

Cyt b₅ se účastní mnoha dějů spojených s přenosem elektronů²³. V endoplazmatickém retikulu se cytochrom b₅ podílí na velkém počtu fyziologických dějů, jako jsou například nasycení a elongace mastných kyselin^{21,24,25}, biosynthesa plasmalogenu²⁶ a cholesterolu²⁷, hydroxylační reakce katalyzované mikrosomálním monooxygenasovým systémem, a tedy na metabolismu endogenní i exogenních látek. V posledních letech je vliv cytochromu b₅ na metabolismus exogenních látek předmětem mnoha vědeckých studií. Navíc se erytrocytární forma cyt b₅ účastní redukce

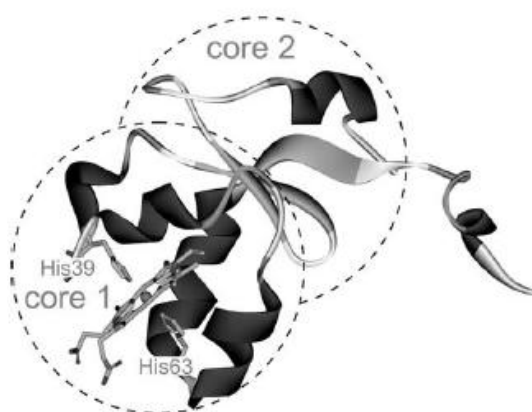
methemoglobinu (Fe^{3+}), který není schopný přenášet kyslík, na funkční hemoglobin (Fe^{2+})²⁸.

1.2.2. Struktura cytochromu b_5

Cyt b_5 se skládá ze dvou domén: větší N-terminální hydrofilní domény, která obsahuje hem a vazebné místo pro redoxní partnery, a C-terminální hydrofobní domény, která kotví protein do fosfolipidové dvojvrstvy endoplazmatického retikula či mitochondrie. Obě domény jsou spojeny vysoce flexibilním peptidovým řetězcem, tvořeným asi 15 aminokyselinovými zbytky. Předpokládá se, že tento spojovací úsek poskytuje doméně s hemem dostatek flexibility k vazbě na různé redoxní partnery, zatímco celý protein zůstává vázaný v membráně²². Byly provedeny pokusy, zda má délka spojovacího úseku vliv na vytváření komplexu mezi cyt b_5 a redoxním partnerem. Výsledkem těchto pokusů bylo, že spojovací úsek musí obsahovat alespoň 7 aminokyselinových zbytků. Menší počet aminokyselinových zbytků vedl ke snížené schopnosti vytvářet funkční komplex s redoxním partnerem. Naopak přidání aminokyselinových zbytků nevedlo k ovlivnění této schopnosti²².

Prostorová struktura celého proteinu ještě nebyla vyřešená, protože hydrofobní doména brání v krystalizaci proteinu a následné rentgenové analýze. Byly provedeny pouze studie s tzv. „krátkým“ proteinem, ve kterém byla membránová kotva odštěpena. Struktura solubilní domény, která váže hem, byla určena pomocí krystalografie²⁹ a NMR spektrometrie³⁰.

Solubilní doména cyt b_5 je tvořena dvěma hydrofobními jádry³¹ (obr. 6, str. 18). Jádro 1 („core 1“) obklopuje hem a má funkční roli, menší jádro 2 („core 2“) s hemem neinteraguje a má pouze strukturní funkci. Hemová skupina je koordinována pomocí dvou histidinových zbytků, His 39 a His 63, na apoprotein (pozice histidinů platí pro potkaní cyt b_5)^{31,32}. Tyto aminokyselinové zbytky chrání železo před interakcí s molekulárním kyslíkem²³.



Obr. 6. 3D struktura solubilní domény potkaního mikrosomálního cyt b_5 ³³

Přítomnost hemové skupiny ovlivňuje i stabilitu celé molekuly proteinu. Termodynamická stabilita apoproteinu je nižší než je tomu u holoproteinu³⁴. Při uvolnění hemové skupiny z jádra 1 dochází ke změně struktury tohoto jádra. Uspořádaná struktura tohoto jádra se mění ve smyčku dlouhou 42 aminokyselin, která už uspořádanost postrádá. Struktura jádra 2 zůstává nezměněna a po asociaci s hemem dojde k opětovnému sbalení jádra 1³⁵.

1.2.3. Mechanismus působení cytochromu b_5

Mechanismus působení cyt b_5 je stále předmětem mnoha studií. Především v posledních letech se zkoumá vliv cyt b_5 na metabolismus exogenních látek, na kterém se podílí hlavně mikrosomální monooxygenasový systém. Cyt b_5 může reakce probíhající v tomto systému stimulovat, inhibovat nebo je nijak neovlivňovat. Bylo prokázáno, že ovlivnění reakcí záleží i na typu účastníčích se substrátu a cytochromu P450. Například metabolismus benzfetaminu katalyzovaný CYP2B4 nebyl ovlivněn přidáním cyt b_5 , ale oxidace 7-ethoxykumarinu byla trojnásobně stimulována³⁶. Pro vysvětlení mechanismu byly navrženy různé teorie (kapitoly 1.2.3.1. – 1.2.3.4.).

1.2.3.1 Urychlení vkládání druhého elektronu

První mechanismus předpokládá přímý přenos druhého elektronu z cyt b_5 na cytochrom P450. Právě přenos druhého elektronu bývá považován za rychlost určující krok monoxygenasové reakce³⁷. Přenos elektronu z redukovaného cyt b_5 bývá rychlejší než transport elektronu z NADPH:cytochrom P450 reduktasy^{38,39}. Rychlejší přijetí elektronu předchází uvolnění částečně aktivovaného kyslíku ve formě superoxidového anionradikálu,

který se pak mění na méně toxický peroxid vodíku. K uvolnění superoxidového anionradikálu dochází v různém rozsahu u všech monooxygenasových reakcí ²³.

1.2.3.2 Posílení spojení komplexu se superoxidovým anionradikálem

V této variantě mechanismu funguje cyt b_5 jako složka systému, která se chová jako pozitivní modifikátor monooxygenas tak, že snižuje četnost rozpojení komplexu se superoxidovým anionradikálem. Právě přes cyt b_5 může druhý elektron vstoupit rychleji do monooxygenasové reakce a předejít tak rozpojení komplexu ³⁸⁻⁴⁰. A dochází tedy ke zvýšení tvorby produktu na úkor tvorby peroxidu vodíku.

1.2.3.3 Vytvoření dvoelektronového akceptorového komplexu

Tento mechanismus je založen na představě, že cyt b_5 vytváří s cytochromem P450 komplex, který může sloužit jako akceptor dvou elektronů během jediné interakce s NADPH:cytochrom P450 reduktasou ⁴¹. Cyt b_5 po redukci cytochromu P450 rychle odebírá elektron z cytochromu P450 (Fe^{2+}), který poté může okamžitě přijmout další elektron. A následně je cyt b_5 (Fe^{2+}) oxidován cytochromem P450 s molekulárním kyslíkem, který se tím redukuje. Kdyby nebyl přítomný cyt b_5 , tak by cytochrom P450 (Fe^{2+}) mohl oddisociovat od reduktasy, následně interagovat s kyslíkem a požadovat druhou interakci s reduktasou ²³. Přijetí dvou elektronů v jediném reakčním kroku vede ke zvyšování rychlosti tvorby aktivovaného kyslíku a tedy k urychlení celé monooxygenasové reakce.

1.2.3.4. Ovlivnění struktury navázáním cytochromu b_5

Nejnovější návrh mechanismu předpokládá, že cyt b_5 slouží jako efektor bez redoxní role v monooxygenasové reakci. Tento předpoklad je založen na představě, že cyt b_5 pomáhá při rozpadu komplexu cytochromu P450 s molekulárním kyslíkem na produkty a cytochrom P450 s atomem železa v oxidovaném stavu Fe^{3+} . Navázání cyt b_5 na cytochrom P450 způsobuje strukturní změny, které mají vliv na schopnost monooxygenasy podstoupit redoxní změny ²³. Pro tento mechanismus svědčí i fakt, že monooxygenasové reakce může ovlivňovat i apo-cyt b_5 . V některých případech může být apo-cyt b_5 stejně efektivní jako cyt b_5 ⁴². Z tohoto poznatku lze vyvodit, že cyt b_5 nemusí prodělávat redoxní změny, ani přenášet elektron na cytochrom P450.

1.3. Vztah struktury a funkce složek MFO

1.3.1. Protein-proteinové interakce v MFO systému

Znalosti interakcí mezi cytochromy P450 a jejich redoxními partnery jsou nezbytné pro kompletní pochopení reakčního mechanismu monooxygenasové reakce ⁴³. Kompletní pochopení reakčního mechanismu může vést k vysvětlení mnohých metabolismů xenobiotik a jejich aktivace v organismu. Protein-proteinové interakce by mohly napomoci i k objasnění mechanismu účinku cytochromu b₅, který není ještě zcela rozluštěn.

Proteinové složky MFO systému mohou vytvářet různě organizované komplexy. Cytochrom P450 je schopen vytvářet binární komplex s NADPH:cytochrom P450 reduktasou i s cyt b₅. Možné je i vytváření ternárního komplexu mezi těmito složkami ²³. Dokonce byla navržena i možnost, že cytochrom P450 se podílí na vytváření ternárního či kvarterního komplexu s NADPH:cytochrom P450 reduktasou ⁴⁴. Cyt b₅ vytváří binární komplex s NADH:cytochrom b₅ reduktasou. Studium protein-protein interakcí může vést k objasnění tvorby těchto komplexů a k objevení nových komplexů.

1.3.1.1. Interakce proteinů s membránou

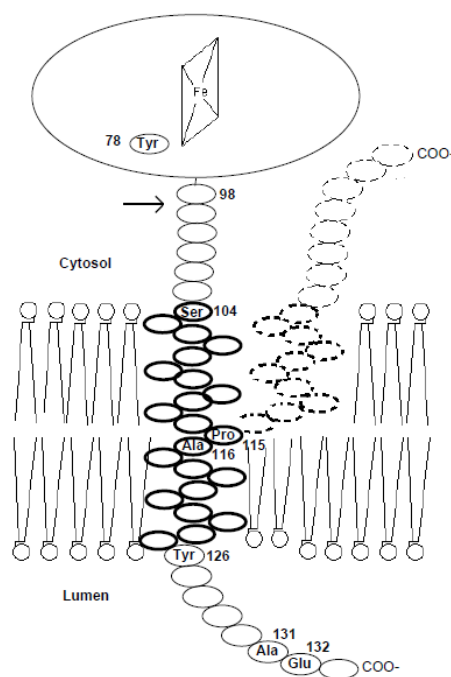
Membrána je velmi důležitou složkou MFO systému. Zřejmě fixací proteinů v jednom směru umožňuje vznik organizovaných reakčních komplexů při laterálním pohybu proteinů v membráně. Podle některých představ by mohla membrána sloužit i jako možný zdroj hydrofobní substrátů pro cytochromy P450.

Cytochrom P450 je do membrány vázaný pomocí N-terminálního hydrofobního konce, který směřuje do lumen endoplazmatického retikula ^{11,45,46}. Hydrofobní N-terminální konec obsahuje speciální signální sekvenci, která umožňuje zakotvení cytochromu P450 do membrány. Signální sekvence je rozpoznána "signal recognition particles" a usměrněna do membrány. A vložení do membrány je zprostředkováno translokonem ^{47,48}. Cytochromy P450 zkrácené o N-terminální hydrofobní úsek mají stejnou nebo sníženou katalytickou aktivitu. Záleží na druhu cytochromu P450 a na délce úseku, o který je cytochrom P450 zkrácen ^{49,50}. Například zkrácená forma králíčího CYP2B4 (Δ 2-27) byla mnohem méně aktivní než nezkrácený CYP2B4 v oxidaci benzfetaminu, *N,N*-dimethylanilinu, nebo 1-fenylethanolu ⁵⁰. Zkrácení a modifikace

N-terminálních úseků CYP2E1 a CYP2B4 mají obecně za následek změnu umístění cytochromu v buňce, a to z membrány do cytosolu ^{50,51}.

NADPH:cytochrom P450 reduktasa je do membrány endoplazmatického retikula zakotvena poměrně malým hydrofobním N-terminálním úsekem (6-10 kDa), který směřuje do lumen endoplazmatického retikula ⁵². Reduktasa zkrácená o N-terminální konec ztrácí schopnost vazby do membrány a vyskytuje se jako solubilní forma ⁵³⁻⁵⁵. Zkrácená reduktasa může přijmout elektrony z NADPH a přenést je na cytochrom c ¹⁵, ale není schopná přenést elektrony na cytochrom P450 a redukovat tak atom železa v hemu ⁵⁶.

Cyt b₅ je do membrány zanořen pomocí C-terminální kotvy. Otázkou však zůstává struktura membránové kotvy a její uspořádání v membráně. Byly navrženy dvě základní možnosti: první předpokládá, že je membránová kotva ve formě α -helixu a prochází celou membránou až do lumenu endoplazmatického retikula ^{21,57}. Druhá možnost upřednostňuje vlásečkovité uspořádání kotvy, která zasahuje jen asi do poloviny síly membrány, kde se v pozici Pro¹¹⁵ obrací a směřuje zpět do cytosolu ^{21,58}. Obě možnosti jsou uvedeny na obr. 7.



Obr. 7. Možnosti uspořádání membránové kotvy cyt b₅ ⁵⁹

Cyt b₅ je syntetizován na volných ribozomech v cytoplasmě a je posttranslačně vkládán do membrány endoplazmatického retikula bez účasti “signal recognition

particles“. Pro vložení cyt b_5 do membrány je důležitý signální úsek deseti AMK na C-terminálním konci, který nese informaci nezbytnou pro nasměrování proteinu do membrány. Zkrácení C-terminálního konce o 11 a více AMK vede ke ztrátě schopnosti nasměrování a ukotvení proteinu do membrány ⁶⁰.

Po odštěpení membránové kotvy je protein stále schopný přenášet elektron na rozpustné formy proteinů, jako je například cytochrom c, ale není schopný elektronového přenosu na mikrosomální cytochrom P450. Tento poznatek dokazuje, že je membránová doména nutná pro funkci cytochromu b_5 v systému cytochromu P450 ²¹.

1.3.1.2. Interakce mezi cytochromem P450 a NADPH:cytochrom P450 reduktasou

Cytochrom P450 je přítomen ve velkém nadbytku oproti NADPH:cytochrom P450 reduktase. Jejich molární poměr nelze zcela jednoznačně určit, protože závisí na aktuálním stavu indukce cytochromů P450. Uvádí se, že v membránách endoplazmatického retikula jaterní tkáně na jednu molekuly reduktasy připadá 10-20 molekul cytochromu P450 ⁶¹. Protože cytochrom P450 vytváří komplex s reduktasou v poměru 1:1 ^{62,63}, musí být reduktasa schopná dodávat elektrony různým cytochromům P450. V případě, že určitý cytochrom P450 má vyšší afinitu pro asociaci s reduktasou, tak elektrony budou přednostně přeneseny na tento cytochrom. Pro cytochromy P450, který jsou méně schopné soutěžit o reduktasu, by měl existovat mechanismus, který jim též umožní přijmout elektrony.

V reakčním cyklu cytochromu P450 je přenos elektronu na komplex cytochrom P450-substrát považovaný za rychlý, ale vykazuje dvoufázovou kinetiku. Rychlý proces je následován pomalejším procesem ⁶⁴. Peterson a spol. ⁶⁵ přišli s konceptem, který by mohl vysvětlovat, jak reduktasa může dodávat elektrony velkému nadbytku cytochromů P450 a proč je redukce cytochromu P450 dvoufázový proces. Z jejich výsledků vyplývá, že až 70 % cytochromů P450 je redukováno v rychlé fázi. A navrhli, že je v membráně několik molekul cytochromu P450 seskupeno kolem jedné molekuly reduktasy. Zbývající molekuly cytochromů P450 jsou redukovány až v pomalejší fázi, když pohybem v membráně dojde k asociaci s reduktasou. Další studie se zabývaly vlivem poměru reduktasy a cytochromu P450 na redukci cytochromu P450. A získaná data nasvědčují, že při zvýšení množství reduktasy dochází ke zvýšení rychlostních konstant pomalé i rychlé fáze, ale množství redukováného cytochromu P450 v pomalé fázi zůstává neovlivněno ⁶⁶.

Tyto výsledky jsou v rozporu s předchozími, kdy bylo uvažováno, že v pomalé fázi jsou redukovány cytochromy P450, které jsou vzdálenější od reduktasy. Vliv rozložení cytochromů a reduktas v membráně na redukci cytochromů je předmětem dalšího studia.

Interakce mezi reduktasou a cytochromem P450 jsou ovlivněny několika faktory, typem cytochromu P450⁶⁷⁻⁶⁹, iontovou silou média^{68,69}. I substrát může ovlivňovat vazbu reduktasy na cytochrom P450⁷⁰. K utváření komplexu mezi cytochromem P450 a reduktasou dochází na základě různých typů interakcí: párováním nábojů, hydrofobními a van der Waalsovy interakcemi^{71,72}. Obecně lze říci, že interagují pozitivně nabitě aminokyselinové zbytky na cytochromech P450 s negativně nabitými zbytky na reduktase. Úseky na reduktase obsahující Asp207-Asp208-Asp209 a Glu213-Glu214-Asp215⁷³ jsou pravděpodobně odpovědné za interakci s cytochromem P450. Modifikací prvního úseku, konkrétně výměnou Asp208 za asparagin, dochází ke snížení k_{cat} pro cytochrom P450, ale nedochází k poklesu redukce cytochromu c. Modifikací v druhém úseku klesá specifická aktivita pro redukci cytochromu c bez ovlivnění demethylace benfetaminu, kterou katalyzuje cytochrom P450^{73,74}. V cytochromech P450 se interakcí s reduktasou účastní především pozitivně nabitě zbytky argininu a lysinu⁷⁵. Například pomocí místně cílené mutagenese bylo prokázáno, že v CYP1A1 jsou za interakce s reduktasou odpovědné Lys 271 a Lys279⁷⁶.

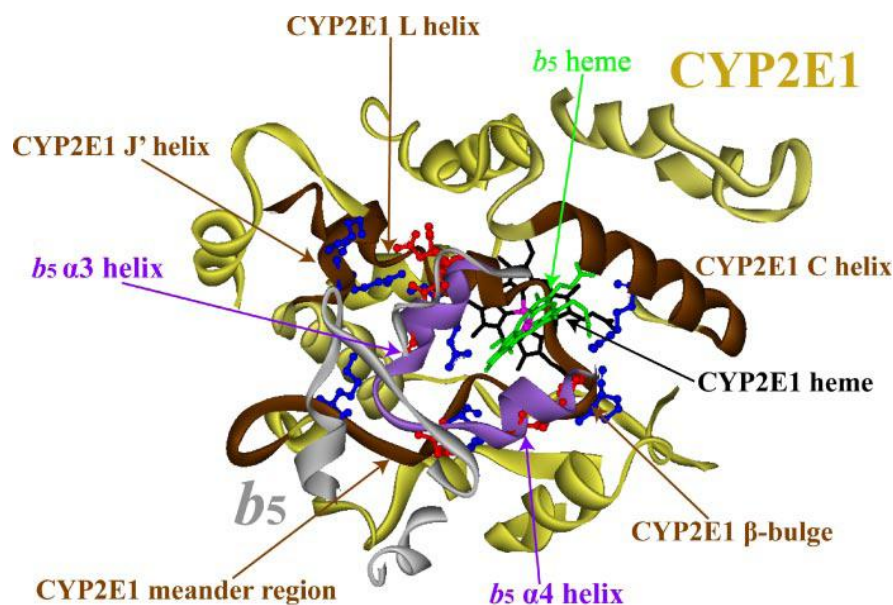
1.3.1.3. Interakce mezi cytochromem b₅ a NADH:cytochrom b₅ reduktasou

Strittmatter⁷⁷ navrhl, že interakce mezi cyt b₅ a NADH:cytochrom b₅ reduktasou zahrnují elektrostatické interakce mezi pozitivně a negativně nabitými aminokyselinovými zbytky a navíc interakci mezi Lys163 reduktasy a propionylovou karboxylovou skupinou hemu v cyt b₅. V dalších studiích bylo pomocí cílené mutagenese prokázáno, že nahrazením pozitivně a negativně nabitých zbytků za alanin dochází ke značnému snížení poměru k_{cat}/K_M , což potvrzuje jejich důležitost pro vzájemné interakce těchto proteinů^{78,79}. Později bylo navrženo, že jsou možné interakce mezi aminokyselinovými zbytky Glu56 a Asp60 cyt b₅ a Lys163 a Lys162 NADH:cytochrom b₅ reduktasy⁸⁰. Novější výsledky potvrzují interakci mezi pozitivně nabitými zbytky Lys162 a Lys163 reduktasy s negativně nabitými zbytky Glu56, Glu59, Asp60 a hemem cyt b₅. A dále bylo navrženo, že se Arg91, Arg142 a Lys294 v reduktase mohou účastnit na interakcích s cyt b₅. Arg91 interaguje s Asp66 a Glu69 cyt b₅. A Arg142 reduktasy silně interaguje s Glu59 a Asp60 cyt b₅. Lys294 reduktasy může interagovat s Glu37, Glu38, Glu43, Glu48 cyt b₅. Dále i Arg91, Arg142

a Lys294 také interagují s hemem cyt b_5 . Pro enzymovou katalýzu jsou nejdůležitější Lys162 a Lys163 reduktasy ⁸¹.

1.3.1.4. Interakce mezi cytochromem P450 a cytochromem b_5

Do interakcí mezi cytochromem P450 a cyt b_5 jsou zapojeny negativně nabitě karboxylové skupiny na cyt b_5 a pozitivně nabitě skupiny na cytochromu P450. Dále se interakcí účastní hydrofobní úsek, který se váže ke komplementárnímu povrchu na cytochromu P450 ⁸². Cytochrom P450 má celou řadu izoform. Jako příklad tvorby binárního komplexu cytochromu P450 a cyt b_5 může posloužit model komplexu CYP2E1 a cyt b_5 , který byl navržen na základě výsledků síťovacích experimentů. Právě podle síťovacích metod bylo prokázáno, že spolu interagují dvě dvojice aminokyselin: Lys428 na CYP2E1 a Asp53 na cyt b_5 , Lys434 na CYP2E1 a Glu56 na cyt b_5 . Podle modelu komplexu (obr. 8) by spolu dále mohly interagovat Lys342 na CYP2E1 a Glu43 na cyt b_5 , Lys422 na CYP2E1 a Glu48 na cyt b_5 a Lys534 na CYP2E1 a Asp60 na cyt b_5 ⁴³.



Obr. 8. Model komplexu CYP2E1-cyt b_5 . CYP2E1 je zobrazen žlutě a jeho hemová skupina černě. Cyt b_5 je znázorněn šedou barvou, hemová skupina zeleně. Interagující aminokyselinové zbytky na CYP2E1 a cyt b_5 jsou znázorněny modře a červeně. Interagující oblasti na CYP2E1 a cyt b_5 jsou zobrazeny hnědě a purpurově. Proteinové části daleko vzdálené od interagujících částí nejsou zobrazeny ⁴³.

1.3.1.5. Interakce mezi cytochromy P450

Cytochromy P450 mohou v roztoku agregovat a vytvářet P450-P450 komplexy. Toto potvrzuje například, že se CYP2B4 vyskytuje jako hexamer a CYP1A2 jako heptamer⁸³.

Přítomnost jednoho typu cytochromu P450 v systému může vést k ovlivnění funkce jiného cytochromu P450 a míra ovlivnění může být závislá na přítomnosti substrátu⁸⁴. Například v rekonstituovaném systému CYP2B4 s NADPH:cytochrom P450 reduktasou po přidání CYP1A2 je výrazně inhibována 7-pentoxyresorufin-O-dealkylace katalyzovaná CYP2B4. Na druhou stranu, demethylace benzfetaminu byla přidáním CYP1A2 ovlivněna minimálně. Následně byly tyto výsledky potvrzeny i v mikrosomální membráně. Právě takové interakce mezi cytochromy P450 mohou mít značný vliv na metabolismus a toxicitu xenobiotik⁸⁵.

1.3.2. Metody pro zjišťování protein-proteinových interakcí

Pro studium protein-proteinových interakcí existuje celá řada metod. Metody se dají rozdělit do dvou základních skupin: metody, kdy reaguje “záření s hmotou“, a metody, kdy reaguje “hmota s hmotou“. Do první skupiny metod patří například NMR, UV/VIS spektrometrie, fluorimetrické techniky. A do druhé skupiny se dají například zařadit chemické modifikační metody (síťování) nebo cílená mutagenese (“site directed mutagenesis”).

1.3.2.1. Síťovací techniky

Síťovacími technikami lze fixovat dočasné funkční komplexy, které vznikají v průběhu katalýzy MFO systémem. Po propojení částí komplexů lze komplex rozštěpit vhodnými peptidasami a vzniklé fragmenty charakterizovat hmotnostní spektrometrií. Tímto postupem lze vytvořit model binárního komplexu a definovat aminokyseliny, které jsou součástí interakčních povrchů a hrají důležitou roli při tvorbě komplexu.

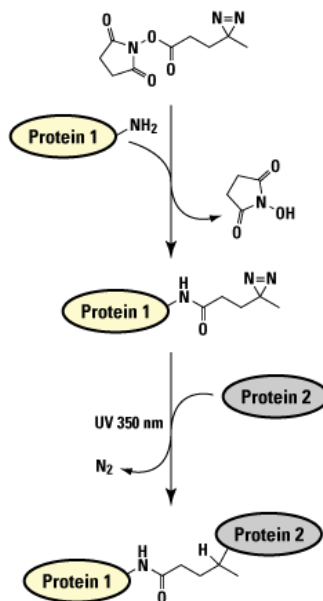
Síťování (“crosslinking“) je proces, při kterém jsou propojeny dvě a více molekul kovalentní vazbou. Pro propojení molekul je zapotřebí **síťovacího činidla** (“crosslinkers“)⁸⁶.

1.3.2.1.1. Síťovací činidla

Síťovací činidlo musí splňovat určité požadavky: musí být stabilní a poskytovat stabilní spojení. Nemělo by způsobovat rozsáhlou denaturaci proteinů. Může být disociabilní, což znamená, že by se měl dát vzniklý komplex rozložit. Nesmí být příliš reaktivní, aby nezreagovalo dříve, než se dostane do místa určení. Fotoaktivovatelná činidla musí být aktivovatelná světlem vlnové délky, které závažně nepoškozuje biomakromolekuly. Celkem bezpečné je světlo vlnových délek vyšších než 300 nm. Fotolabilní skupina by v této oblasti měla mít výrazná absorpční maxima garantující dostatečnou účinnost fotolýzy při relativně nízkých výkonech světelných zdrojů. Intermediáty vznikající fotolýzou by měly být vysoce reaktivní s minimální selektivitou. Důležité je i to, aby tyto intermediáty nepodléhaly přesmykům na méně reaktivní deriváty⁸⁷.

Síťovací činidla mohou být buď homobifunkční nebo heterobifunkční. Homobifunkční činidla mají dvě identické reaktivní skupiny a často jsou používány k propojení proteinů v jednom kroku. Heterobifunkční činidla mají dvě rozdílné reaktivní skupiny, které umožňují propojení ve dvou krocích a pomáhají minimalizovat nežádoucí polymerace nebo zreagování činidla sama se sebou. Síťovací činidla obsahují reaktivní skupiny, které jsou schopné reagovat se specifickými skupinami na proteinech. Mezi specifické skupiny na proteinech patří zejména: primární aminoskupin ($-NH_2$), thiolová skupina ($-SH$), karboxylová skupina ($-COOH$) a karbonylová skupina ($-CHO$) v případě navázaného sacharidu na protein. Reaktivní skupiny na síťovacích činidlech jsou následující: pro karboxylovou skupinu karbodiimid, pro karbonylovou skupinu hydrazin, pro thiolovu maleimid nebo pyridyldisulfid a pro aminoskupinu například iminoester. Když nejsou známy specifické skupiny na proteinu nebo jiné biomakromolekule, je vhodné použít nespecifické reaktivní skupiny, diaziriny a aryl azidy^{86,88}. Diaziriny a aryl azidy patří mezi fotoaktivovatelná činidla. Jsou to chemicky celkem stabilní sloučeniny, které se stávají reaktivní až po aktivaci UV zářením. Jsou vhodné pro studium protein-proteinových interakcí, protože se dají aktivovat až po vytvoření komplexu mezi proteiny. Diaziriny jsou oproti aryl azidům stabilnější a dají se aktivovat vyššími vlnovými délkami (330-370 nm), což zamezuje možnému poškození biomakromolekul⁸⁶.

Schéma mechanismu síťování pomocí heterobifunkčního činidla obsahujícího diazirin a N-hydroxysukcinimid (NHS) je uvedeno na obr. 9.



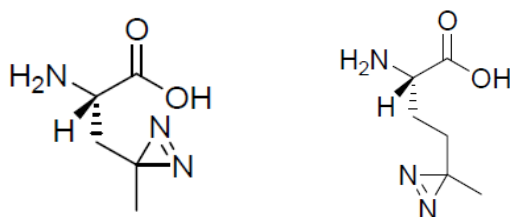
Obr. 9. Mechanismus síťování pomocí NHS-esteru diazirinu. NHS-ester reaguje s primární aminoskupinou a vytváří se stabilní amidová vazby. Následuje pak fotoaktivace diazirinu UV zářením (330-370 nm). Z diazirinu se odštěpí N_2 a vzniká vysoce reaktivní karben, který může reagovat s dalším proteinem ⁸⁹.

1.3.2.2. Příprava a použití fotoaktivovatelných proteinů

Fotoaktivovatelných proteinů lze využít při studiu protein-proteinových interakcí. Aktivací těchto proteinů lze fixovat dočasné funkční komplexy, které vznikají během monoogxygenasové reakce.

Inkorporace modifikovaných aminokyselin do proteinu bez modifikace translačního aparátu jsou vzácné ⁹⁰ a obvykle omezené na bakterie. A mnoho z nich je založeno na mimořádně promiskuitě methionin-tRNA synthetasy (MetRS) ^{91,92}. Další aminoacyl-tRNA synthetasy (aaRSs) jsou více selektivní, a proto nahrazení přirozených aminokyselin je omezeno na případy, které se týkají aminokyselin jako jsou fluorované deriváty leucinu, fenylalaninu a tryptofanu ⁹³. Tato metoda nepotřebuje speciálně upravené aminoacyl-tRNA synthetasy ani tRNA. Což lze využít k inkorporaci fotolabilních derivátů aminokyselin, leucinu a methioninu, do proteinu eukaryotickou buňkou ⁹⁴. Obě modifikované aminokyseliny (obr. 10, str. 28) obsahují fotolabilní diazirinový kruh, který

se po aktivaci UV zářením mění na vysoce reaktivní karben, který může reagovat s jinou molekulou.



Obr. 10. Vzorce fotolabilních aminokyselin. Zleva L-foto-leucin, L-foto-methionin.

Při produkci proteinu s fotolabilními aminokyselinami musí být pro zamezení kompetice mezi fotolabilními a nemodifikovanými aminokyselinami použito limitní medium, které neobsahuje L-leucin a L-methionin. Nevýhodou je ten fakt, že oproti kultivacím v kompletním růstovém mediu dochází k redukci biosynthesy proteinu ⁹⁴. V předkládané práci je právě testována tato metoda pro inkorporaci fotolabilních derivátů aminokyselin, leucinu a methioninu, do cyt b₅. Na obr. 11 jsou označeny pozice leucinů a methioninů, které by mohly být nahrazeny fotolabilními aminokyselinami.

MAAQSDKDVKYITLEEIKKHNSKSTWLILHHKVYDLTKFLEEHPGGEEVLRQ
AGGDATEFEDVGHSTDARELSKTFIIGELHPDDRSKLSKPMETLITTVDSNSSWW
TNWVIPAISALIVALMYRLYMADD

Obr. 11. Primární struktura králičího mikrosomálního cytochromu b₅ s červeně vyznačenými aminokyselinami leucinu a methioninu.

2. Cíl bakalářské práce

Cílem bakalářské práce bylo vypracování techniky pro produkci rekombinantního cyt b_5 s modifikovanými aminokyselinami s výhledem inkorporace fotolabilních aminokyselin.

K dosažení cíle bylo nutné:

1. Nalézt vhodné kultivační medium, teplotu kultivace a vhodný čas pro dosažení maximální produkce cyt b_5 .
2. Za optimalizovaných podmínek prověřit míru inkorporace deuterované modelové aminokyseliny do purifikovaného cyt b_5 pomocí hmotnostní spektrometrie.
3. Pro studium inkorporace hemu exprimovat cyt b_5 za různých teplot a provést jeho izolaci.
4. U purifikovaných preparátů určit zastoupení holoproteinu v celkovém proteinovém preparátu a případně prokázat možnost rekonstituce holoproteinu přidavkem heminu.

3. Materiál a metody

3.1. Použitý materiál a chemikálie

Duchefa Biochemie, Holandsko

ampicilin

Fluka, Švýcarsko

Akrylamid; dodecylsulfát sodný (SDS); 2-merkaptoethanol; N,N-methylen-bis-akrylamid (BIS); tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)

Lachema Brno / Lachner, Česká republika

KH_2PO_4 , EDTANa_2 (chelaton 3), glycerol, ethanol, kyselina octová, NaHCO_3 , Na_2CO_3 , vínan sodný, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, KCl, octan sodný, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, bromfenolová modř, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, NaOH, KOH, NaCl, persíran amonný

Linde, Česká republika

dusík (g), kapalný dusík

PAA, Rakousko

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)

Pharmacia, Švédsko

DEAE-Sepharosa CL6B

Reanal Budapešť, Maďarsko

glycin

Roche Diagnostic, Německo

tablety proteasových inhibitorů (Complete mini protease inhibitor)

Serva, Německo

Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBB), N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin (TEMED)

Sevapharma, a.s, Česká republika

hovězí sérový albumin (BSA)

Sigma, USA

LB medium, LB agar, isopropylthio- β -D-galaktosid (IPTG), Brij 35, 4,4'-dikarboxy-2,2'-bicinchoninová kyselina (BCA), cholát sodný, d₃-methyl-L-methionin, hemin chlorid, proteinové standardy pro polyakrylamidovou gelovou elektroforesu v prostředí SDS „Wide range“

Stratagene, USA

Bakteriální kmen *E. coli* BL-21 (DE3) Gold

Thermo Scientific, USA

DMEM-LM (Dulbecco's Modified Eagle's Limiting Medium)

3.2. Použité přístroje**Analytické váhy:**

40 SM-200A (Pesa), HM-200 (A&D Instruments LTD)

Předvážky:

440-35-N (Kern), EW 600-2M (Kern), EK-600H (A&D Instruments LTD)

Centrifugy:

Beckman LE-80K (Beckman Coulter), Eppendorf 5415 D/R (Eppendorf), Janetzki K70D (MLW), Allegro X-22R (Beckman Coulter), stolní minicentrifuga (Labnet), stolní minicentrifuga Gilson (GmC Lab)

Vodní lázně:

Julabo TW2 (Biotech), Julabo TW8 (Biotech), GFL 1092 (MERCY) – třepací

Spektrofotometry:

Spectromom 195D (MOM Budapest), Spekol 11 (Carl Zeiss, Jena), Specord M40 (Carl Zeiss, Jena), Diod Array 8453 (Hewlett-Packard)

Inkubátory:

IR 1500 Automatic CO₂ Incubator (Flow Laboratories), ORBI-SAFE TS Net Wise (Gallenkamp)

Elektroforetická aparatura:

MiniVE Vertical (Amersham Biosciences)

Zdroj pro elektroforesu:

EPS 301 Electrophoresis Power Supply (Amersham Pharmacia Biotech)

Další přístroje:

Vortex MS 1 Minishaker (Schoeller Pharma), pH metr model 370 (Ati Orion), magnetické míchačky HM 2A (Laboratorní přístroje Praha), KMO2 basic (IKA), sběrač frakcí BioLogic BioFrac (BIO-RAD) a sběrač frakcí model 2128 (BIO-RAD), peristaltická pumpa PP 05 (Laboratorní přístroje Praha), ultrafiltrační cela (Amicon), drtič ledu Solid, homogenisator dle Pottera a Elvehjema, ultrazvuková sonda Sonopuls HD 3100 (Bandelin), sonikátor ELMasonic E 30 H (P-Lab) bezdotykový kahan Gasprofi2 SCS (VLD-TEC), laminární box BIO 126 (Labox), autokláv Varioklav 400E (H+P Labortechnik), automatické pipety BIOHIT a Nichipet EX (Nichiryo), přístroj pro produkci ultračisté vody Simplicity 185 (Millipore)

3.3. Analytické metody**3.3.1. Stanovení koncentrace proteinů**

Koncentrace proteinů byla určována metodou podle Wiechelman a spol.⁹⁵, ve které je využívána schopnost postranních skupin některých aminokyselin redukovat měďnaté ionty přítomné v činidle na měďné ionty. Měďné ionty jsou následně chelátovány 4,4'-dikarboxy-2,2'-bicinchoninovou kyselinou (BCA) za vzniku modro-fialového komplexu, který se dá stanovit spektrofotometricky při vlnové délce 562 nm. Intenzita zbarvení je přímo úměrná koncentraci proteinu v roztoku.

Činidlo potřebné pro stanovení koncentrace proteinu ($V = 30$ ml) bylo připraveno rozpuštěním 0,3 g BCA ve 29,4 ml roztoku A (0,4 % NaOH; 0,95 % NaHCO_3 ; 2 % $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 0,16 % vínan sodný; pH 11,25). Po rozpuštění BCA bylo přidáno 0,6 ml roztoku B (4 % $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ v destilované vodě). Koncentrace BCA byla v činidle 1 % (w/v). Činidlo bylo připraveno těsně před přidáním ke standardům a vzorkům.

Do sterilních mikrozkušavek dle Eppendorfa (1,5 ml) bylo pipetováno 20 μl vzorku a 980 μl činidla. Pro sestrojení kalibrační křivky bylo do mikrozkušavek pipetováno 20 μl standardu BSA o koncentracích 0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8, 1,0 a 1,3 mg/ml a přidáno 980 μl činidla. Vzorky, u kterých měla být stanovena koncentrace byly naředěny destilovanou vodou. Standardy byly stanovovány v dubletech. Referentní vzorky a vzorky s neznámými koncentracemi v tripletech. Po přidání činidla byly vzorky promíchány a inkubovány 60 min při teplotě 60 °C v inkubátoru Julambo TW8. Po inkubaci byla změřena absorbance standardů a vzorků při 562 nm proti referentnímu vzorku, který obsahoval 20 μl destilované a 980 μl činidla. Z naměřených hodnot byla sestrojena kalibrační křivka. Z regresní rovnice kalibrační křivky byla vypočtena koncentrace proteinu ve vzorcích. Vypočtené hodnoty byly následně zprůměrovány. Měření bylo prováděno na spektrofotometru Spektronom 195D v kyvetě o optické dráze 1 cm.

3.3.2. Spektrofotometrická charakterizace finálního preparátu cytochromu b_5

3.3.2.1. Stanovení koncentrace cyt b_5 z absolutního spektra

Z absolutního spektra finálního preparátu při vlnových délkách 280 a 413 nm byla stanovena koncentrace cyt b_5 . Cyt b_5 díky navázanému hemu vykazuje absorpční maximum při vlnové délce 413 nm. Při vlnové délce 280 nm absorbuje cyt b_5 i apo-cyt b_5 . Koncentrace cyt b_5 a apo-cyt b_5 byla stanovena s použitím molárních absorpčních koeficientů: $\epsilon_{413} = 117 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ^{19,96} a $\epsilon_{280} = 29,45 \text{ mM}^{-1}$ ⁹⁷.

Koncentrace byly počítány podle následujících vzorců:

$$c_{280} = \frac{A_{280} - A_{350}}{\epsilon_{280} \cdot l} \cdot \text{ředění} \cdot 1000 \quad [\mu\text{mol/l}]$$

$$c_{413} = \frac{A_{413} - A_{500}}{\epsilon_{413} \cdot l} \cdot \text{ředění} \cdot 1000 \quad [\mu\text{mol/l}]$$

kde c_{280} a c_{413} jsou koncentrace proteinů nebo cyt b_5 při vlnové délce absorpčního maxima (x nm) [$\mu\text{mol/l}$], A_x absorbance při vlnové délce x [nm], ϵ_x molární absorpční koeficient při vlnové délce x nm [$\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$] a l optická dráha [cm]

3.3.2.2. Stanovení cytochromu b_5 z diferenčního spektra

Finální preparát cyt b_5 byl naředěn pufrém (20 mM TRIS/HCl; 1 mM EDTA; 0,4 % cholát sodný; pH 8,0) na koncentraci proteinů 0,25 mg/ml. Spektrum bylo měřeno na dvoupaprskovém spektrofotometru Spekord M40 v kyvetě o optické dráze 1 cm. Naředěný cyt b_5 byl rozdělen do vzorkové a referentní kyvety a byla proměřena základní linie v rozmezí 400 – 500 nm. Cyt b_5 ve vzorkové kyvetě byl redukován přidáním 10 μl 10 % $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$. Následně bylo změřeno spektrum redukované formy cyt b_5 proti oxidované formě, tedy diferenční spektrum. V diferenčním spektru se objeví charakteristická maxima při 556 a 424 nm, a minimum při 409 nm⁹⁸. Pomocí molárního absorpčního koeficientu $\epsilon_{424-409} = 185 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ⁹⁶ byla vypočtena koncentrace cyt b_5 ve vzorku. Koncentrace byla počítána podle vzorce:

$$c_{\text{cyt } b_5} = \frac{A_{424} - A_{409}}{\epsilon_{424-409} \cdot l} \cdot \text{ředění} \cdot 1000 \quad [\mu\text{mol/l}]$$

Stejným postupem byla stanovena koncentrace cyt b_5 po rekonstituci s heminem.

3.4. Inkorporace hemu do apo-cytochromu b_5

Pracovní roztok heminu (1mM) byl připraven rozpuštěním hemin chloridu v 50 % ethanolu mícháním nejméně 15 min. Následně bylo míchání přerušeno a po sedimentaci nerozpuštěného podílu bylo z roztoku odebráno 10 μl a přidáno k 990 μl pufru A (20mM TRIS/HCl, 1mM EDTA, pH 8,0) a byla měřena absorbance TRIS-ligandu heminu při 385 nm v křemenné kyvetě. Dále bylo do původního roztoku heminu přidáno 20 μl 1 M NaOH pro další rozpuštění heminu. Znovu byl roztok několik minut míchán a následně bylo opět odebráno 10 μl a přidáno k 990 μl pufru A změřena absorbance při 385 nm. Tento postup byl opakován celkem 4 x, dokud přídavek NaOH způsoboval zvýšení absorbance při 385 nm. Pak byl roztok heminu přefiltrován přes filtr s póry 0,22 μm a naředěn na koncentraci 0,1 mM.

Izolovaný cytochrom b_5 s převažujícím obsahem apo-formy byl naředěn pufrém B (20 mM TRIS/HCl, 1 mM EDTA, 0,4 % cholát sodný, pH 8,0) na koncentraci proteinů

0,25 mg/ml. K naředěnému roztoku apo-cyt b₅ (0,5 ml) bylo přidáváno 5 µl připraveného roztoku heminu a rekonstituce apo-cyt b₅ s hemem byla monitorována spektrofotometricky na spektrofotometru Hewlett Packard 8543 v křemenné kyvetě o optické dráze 1 cm. Po každém přidavku bylo změřeno spektrum (300-500 nm). Rekonstituce byla považována za kompletní, když absorbance při 385 nm vykazovala zvýšený nárůst, což dokazovalo přítomnost volného TRIS-ligandu heminu.

3.5. SDS elektroforesa na polyakrylamidovém gelu

3.5.1. Příprava polyakrylamidového gelu

Příprava je popsána pro jeden gel, pro přípravu více gelů bylo postupováno analogicky. Skla určená pro elektroforesu byla umyta, odmaštěna ethanolem a uchycena do držáku pro přípravu gelů. Mezi skla byl nanesen roztok pro přípravu 15 % separačního gelu, který byl připraven z 3,5 ml pufru A (0,375 M TRIS/HCl; 0,1% SDS (w/v); pH 8,8), 3,5 ml polymeračního roztoku A (30% akrylamid (w/v); 0,8% BIS v pufru A), 7 µl TEMED a 70 µl 10 % persíranu amonného (w/v). Následně byl roztok pro přípravu gelu opatrně převrstven destilovanou vodou. Po zpolymerování gelu byla destilovaná voda odlita a povrch gelu byl vysušen filtračním papírem. Na separační gel byl nanesen roztok pro přípravu 4% zaostřovacího gelu, který byl připraven z 2,6 ml pufru B (0,125 M TRIS/HCl; 0,1% SDS (w/v); 0,0006% bromfenolová modř; pH 6,8), 400 µl polymeračního roztoku B (30% akrylamid (w/v); 0,8% BIS v pufru B), 3 µl TEMED a 60 µl 10 % persíranu amonného (w/v). Do zaostřovacího gelu byl vložen hřeben k vytvoření jamek pro vzorky. Po zpolymerování byl hřeben vyjmut a horní elektrodový prostor byl vyplněn elektrodovým pufrům (0,025 M TRIS/HCl; 0,192 M glycin; 0,1 % SDS (w/v); pH 8,3).

3.5.2. Příprava vzorků

Vzorky pro porovnání produkce cyt b₅ (kapitola 3.6.2) byly ředěny destilovanou vodou tak, aby ve všech vzorcích byl přibližně stejný počet bakterií, tedy aby absorbance při 600 nm byla v rozmezí 0,240 - 0,245. Všechny vzorky byly dále ředěny 2 x nebo 4 x koncentrovaným vzorkovým redukujícím pufrům (0,063 M TRIS/HCl; 2 % SDS (w/v); 10% glycerol (v/v); 5 % 2-merkapt ethanol (v/v); 0.003 % bromfenolová modř (w/v); pH 6,8). Dále byly vzorky povařeny 5 min na vodní lázni. Poté byly sedimentovány na stolní centrifuze a aplikovány po 20 µl do jamek v zaostřovacím gelu.

3.5.3. Průběh elektroforesy

Skleněné desky s gelem byly umístěny do elektroforetické vany a spodní prostor byl vyplněn elektrodovým pufrem. Elektroforesa probíhala ve vertikálním uspořádání nejdříve 30 min při napětí 80 V, které bylo pak změněno na hodnotu 150 V. Elektroforesa byla ukončena, když čelo s bromfenolovou modří dorazilo ke spodnímu okraji separačního gelu. Následně byl gel vyjmut, odstraněn zaostřovací gel a separační gel přenesen do barvicí lázně (25% Coomassie Brilliant Blue R-250 (w/v); 46% ethanol (v/v); 9,2% kyselina octová (v/v)) na 60 minut. Po nabarvení byl gel přesunut do odbarvovací lázně (25% ethanol (v/v); 10% kyselina octová (v/v)), kde by ponechán odbarvovat přes noc.

V případě provedení elektroforesy pro hmotnostní spektrometrii bylo pracováno s rouškou a příkrývkou hlavy, aby gel nebyl kontaminován jinými proteiny, zejména keratiny, které by mohly rušit detekci deuterovaného proteinu.

3.6. Příprava a izolace rekombinantního cytochromu b₅

3.6.1. Transformace kompetentních buněk

Pro transformaci byl jako expresní vektor použit plazmid pET-22b s vloženým genem pro králičí jaterní cyt b₅. Tento plazmid byl připraven v naší laboratoři.

Dvě mikrozkušavky s 200 µl suspenze kompetentních buněk *E.coli* BL-21 (DE3) Gold byly nechány rozmraznout na ledu. Po rozmrznutí buněk byly do jedné suspenze přidány 3 µl plazmidu a do druhé 3 µl destilované vody. Buňky s destilovanou vodou sloužily jako kontrola. Směs byla nechána 30 min na ledu. Pak byl proveden tzv. tepelný šok ("heat shock"), buňky byly dány do vodní lázně o teplotě 42°C na dobu 90 s. Ihned poté byly uloženy na led. Po 2 min. bylo do každé mikrozkušavky přidáno 600 µl sterilního LB media bez antibiotika. Směsi byly promíchány a inkubovány po dobu 60 min při teplotě 37 °C. Dále bylo na předem připravené plotny s LB agarem, který obsahoval 100 µg/ml ampicilinu (Amp), nanášeno a rozetřeno sterilní mikrobiologickou hokejkou 400 µl buněk. Buňky byly nechány růst přes noc při teplotě 37 °C.

3.6.2. Kultivace bakterií a produkce cytochromu b₅

3.6.2.1 Produkce cytochromu b₅ v LB mediu při 37 °C

Do sterilního LB media (500 ml) temperovaného na 37 °C bylo přidáno takové množství Amp, aby jeho výsledná koncentrace v mediu byla 100 µg/ml. Na plotnu s vyrostlými bakteriemi byl nanesen 1 ml sterilního LB media a v něm byly bakterie resuspendovány. Touto suspenzí bylo medium s Amp zaočkováno. Po zaočkování byl odebrán 1 ml a byla změřena počáteční optická densita při 600 nm proti LB mediu na spektrofotometru Spekol 11 ve skleněných kyvetách s optickou drahou 1 cm. Z kyvety byl odebrán vzorek pro elektroforesu. Vzorek byl odstředěn (3min, 6000 RPM, laboratorní teplota, centrifuga Eppendorf 5415 D/R). Medium bylo odlito a peleta byla resuspendována ve 100 µl destilované vody. Zaočkované medium bylo kultivováno při 37 °C za třepání 200 RPM. Každou hodinu byly odebírány vzorky, měřena jejich optická densita a podle předchozího postupu byly dále zpracovány. Když optická densita kultury dosáhla hodnoty okolo 1, byla do kultury přidána δ-aminolevulová kyselina (δ-ALA) a isopropylthio-β-D-galaktopyranosid (IPTG) v takovém množství, aby výsledná koncentrace δ-ALA byla 0,5 mM a IPTG 1 mM. Přidáním IPTG byla indukována produkce cyt b₅. Kultura byla kultivována další 4 hod. Opět byla každou hodinu měřena optická densita a odebírány vzorky. Po 4 hod byla kultura odstředěna (20 min, 3000 RPM, 4 °C, centrifuga Janetzki K70D) a pelety byly resuspendovány v 10 mM draselno-fosfátovém pufru (1 mM EDTA, pH 7,7) a celkový objem byl upraven na 25 ml. Suspenze byla uchovávána při - 5 °C.

3.6.2.2. Porovnání produkce cytochromu b₅ v odlišných mediích

Postup byl prováděn stejně jako v kapitole 3.6.2.1. s tím rozdílem, že byly bakterie kultivovány ve 25 ml media a media byla zaočkována na počáteční optickou densitu 0,07. V případě převedení kultury do jiného média, byla kultura při dosažení hodnoty optické density okolo 1 odstředěna (15 min, 2500 RPM, laboratorní teplota, centrifuga Allegro X-22R s úlovým rotorem 4250). Medium bylo odlito a peleta byla resuspendována ve 40 ml sterilního PBS (0,134 M NaCl; 1,8 mM Na₂HPO₄·12H₂O; 1 mM NaH₂PO₄·2H₂O; pH 7,2) a znovu odstředěna za stejných podmínek. Pelety byly resuspendovány v DMEM-LM a objem byl upraven na 25 ml. Po 20 min bylo přidáno 5,25 mg D,L-leucinu a 0,75 mg d₃-methyl-L-methioninu. Po dalších 10 min bylo přidáno takové množství δ-ALA a IPTG,

aby výsledná koncentrace δ -ALA byla 0,5 mM a IPTG 1 mM. Produkce cyt b_5 ve vzorcích, odebraných po 2, 4 a 24 hod produkce, byly porovnány pomocí elektroforesy. Vzorky byly ředěny na přibližně stejnou optickou densitu při 600 nm (0,240-0,245).

3.6.2.3. Studium inkorporace hemu při produkci cytochromu b_5

Postup kultivací a produkci byl prováděn stejně jako v kapitole 3.6.2.1. s tím rozdílem, že produkce byly prováděny při teplotách 20 a 27 °C. Poté, co kultura dosáhla optické density okolo 1, byla kultura odstředěna (15 min, 2500 RPM, 20 nebo 27 °C, centrifuga Allegro X-22R s úlovým rotorem 4250). Medium bylo odlito a peleta byla resuspendována ve sterilním pufru PBS (0,134 M NaCl; 1,8 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$; 1 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; pH 7,2) a znovu odstředěno za stejných podmínek. Pufr byl oddělen a pelety byly resuspendovány v DMEM-LM, objem byl upraven na 430 ml. Po 20 min bylo přidáno 90,3 mg D,L-leucinu a 12,9 mg d_3 -methyl-L-methioninu. Po dalších 10 min bylo přidáno IPTG a δ -ALA v takovém množství, aby výsledná koncentrace δ -ALA byla 0,5 mM a IPTG 1mM. Cyt b_5 byl produkován 5 hodin. Další postup byl prováděn stejně jako v kapitole 3.6.2.1..

3.6.3. Izolace cytochromu b_5 z bakteriálních buněk

3.6.3.1. Izolace membránové frakce

Suspenze (z kapitol 3.6.2.1. a 3.6.2.3.) o objemu 25 ml byla nechána rozmraznout. Následně byla do suspenze přidána 1 tableta proteasových inhibitorů (“complete mini protease inhibitor“). Buňky byly rozrušeny sonikací pomocí sondy TE 76 ponořené ve vzorku. Bylo provedeno 8 sonikačních cyklů trvajících 2,5 min při výkonu sondy 40 W. Při provádění sonikace byly buňky drženy na ledu a mezi jednotlivými cykly byly chlazeny 5 min ledovou drtí. Zbytky buněk a nerozrušené buňky byly odstraněny centrifugací (15min, 4500 RPM, 4 °C na centrifuze Allegro X-22R s úhlovým rotorem 4250). Supernatant byl přelit do ultracentrifugační kyvety a odstředěn (75 min, 60 000 RPM, 4 °C, ultracentrifuga Beckman LE-80K s úhlovým rotorem Ti 70). Supernatant byl oddělen a peleta byla suspendována homogenizací ve 20 mM draselno-fosfátovém pufru (1 mM EDTA; 20 % glycerol (v/v); pH 7,7) a objem byl upraven na 25 ml. V takto získané suspenzi byla stanovena koncentrace proteinů.

3.6.3.2. Solubilizace cytochromu b₅ z membrán

Všechny následující postupy byly prováděny v chlazené místnosti při teplotě 4 °C. Membránová frakce byla naředěna 20 mM draselno-fosfátovým pufrém (1 mM EDTA; 20 % glycerol (v/v); pH 7,7) na výslednou koncentraci proteinů 4 mg/ml. Následně byla přidána další tableta proteasových inhibitorů. Pro solubilizaci membrán byla do suspenze za stálého míchání po kapkách přidávána směs 30 % Brij 35 a 10 % cholát sodný (w/v) v takovém množství, aby jejich koncentrace v roztoku byla 1 mg detergentu/1 mg proteinu. Roztok byl pak míchán 2 hod. Nerozpuštěné podíly byly odstraněny centrifugací (75 min, 60 000 RPM, 4 °C, ultracentrifuga Beckman LE-80K s úhlovým rotorem Ti 70). Supernatant obsahující solubilizovaný cyt b₅ byl nanesen na ekvilibrovanou kolonu s DEAE-Sepharosou CL6B.

3.6.3.3. Chromatografie na koloně DEAE-Sepharosy CL6B

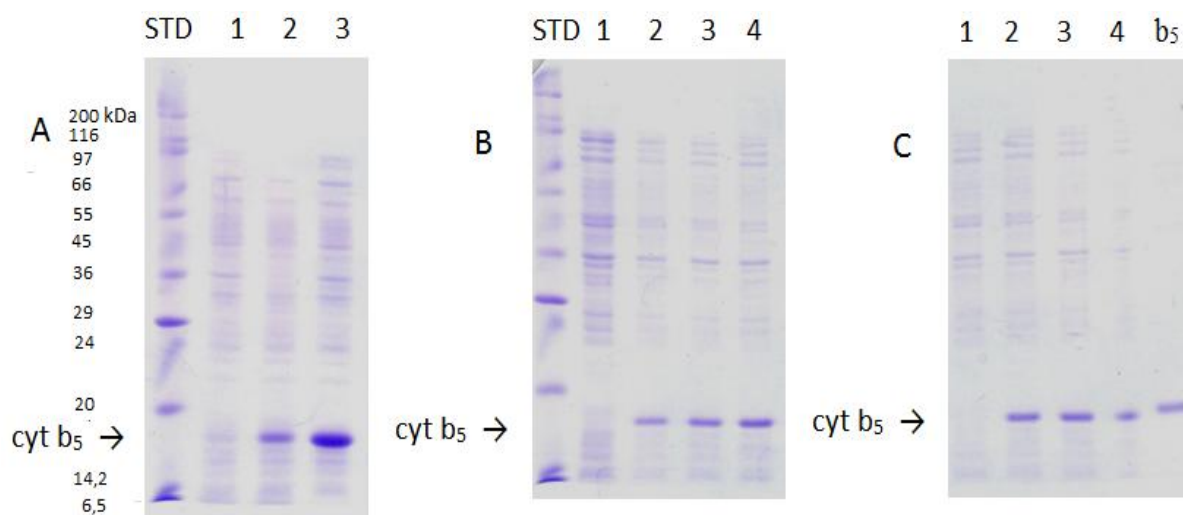
DEAE-Sepharosa byla před použitím promyta 3 x 300 ml destilované vody, rozmíchána v 200 ml cyklizačního pufru (1 M K/PO₄; pH 7,7) a nechána přes noc při 4 °C. Druhý den byla znovu rozmíchána v cyklizačním pufru, promyta 3 x 300 ml destilované vody. Voda byla odsáta pomocí vývěvy a Sepharosa byla rozmíchána ve 100 ml pufru pro nalévání kolony (20 mM K/PO₄; 1 mM EDTA; 20 % glycerol (v/v); pH 7,7) a 60 ml bylo vneseno do kolony (2,5 x 30 cm). Po usazení nosiče byla kolona ekvilibrována 300 ml ekvilibračního pufru (20 mM K/PO₄; 1 mM EDTA; 20 % glycerol (v/v); 0,6 % Brij 35; pH 7,7). Supernatant se solubilizovaným cyt b₅ byl nanášen na kolonu rychlostí 1 ml/min a byly jímány frakce o objemu cca 10 ml. Cyt b₅ byl zachycen na nosiči. Po nanesení vzorku byla kolona promývána ekvilibračním pufrém do poklesu absorbance při 280 nm na nulu. Cyt b₅ byl eluován lineárním gradientem 2 x 300 ml 0 – 400 mM KCl v ekvilibračním pufru. U všech frakcí byla změřena absorbance při 280 a 413 nm proti první frakci a byl vytvořen graf závislosti absorbance na objemu, který protekl kolonou (eluční profil). U vybraných frakcí byla zjištěna čistota cyt b₅ pomocí SDS elektroforesy. Frakce s vysokým podílem cyt b₅ a dostatečnou čistotou byly spojeny a zahuštěny ultrafiltrací v aparatuře Amicon s membránou PM 10 (Milipore). Zahuštěné frakce byly dialyzovány proti 2000 ml 15 mM draselno-fosfátového pufru (1mM EDTA; 20 % glycerol; 0,3 % Brij 35; pH 7,7).

Detergent Brij 35 byl odstraněn rechromatografií na koloně DEAE-Sepharosy ($V = 20$ ml, $29 \times 1,3$ mm), která byla připravena stejně jako v předchozím případě s tím rozdílem, že byla ekvilibrována rozdílným ekvilibračním pufrem (15 mM K/PO₄; 1mM EDTA; 20 % glycerol; 0,1 % cholát sodný; pH 7,7). Zahuštěný a dialyzovaný preparát cyt b₅ byl na kolonu nanášen rychlostí 0,4 ml/min a byly jímány frakce o objemu 2 ml. Po nanesení vzorku byla kolona promyta 100 ml ekvilibračního pufru pro odmytí detergentu. Cyt b₅ byl následně eluován izokraticky pufrem o vysoké iontové síle (200 mM K/PO₄; 200 mM KCl; 1 mM EDTA; 20 % glycerol; pH 7,7). V jímáných frakcích byly změřeny absorbance při 280 a 413 nm a frakce, které měly hodnotu absorbance při 413 nm minimálně 10 % z maximální hodnoty, byly dále dialyzovány proti 2000 ml 50 mM draselno-fosfátového pufru (20 % glycerol; pH 7.7). Dialýzou byl odstraněn cholát sodný. Výsledný preparát byl zahuštěn ultrafiltrací (membrána PM-10, Millipore), uschován po menších alikvotech (200 µl), zamražen v kapalném dusíku a skladován při - 80 °C.

4. Výsledky

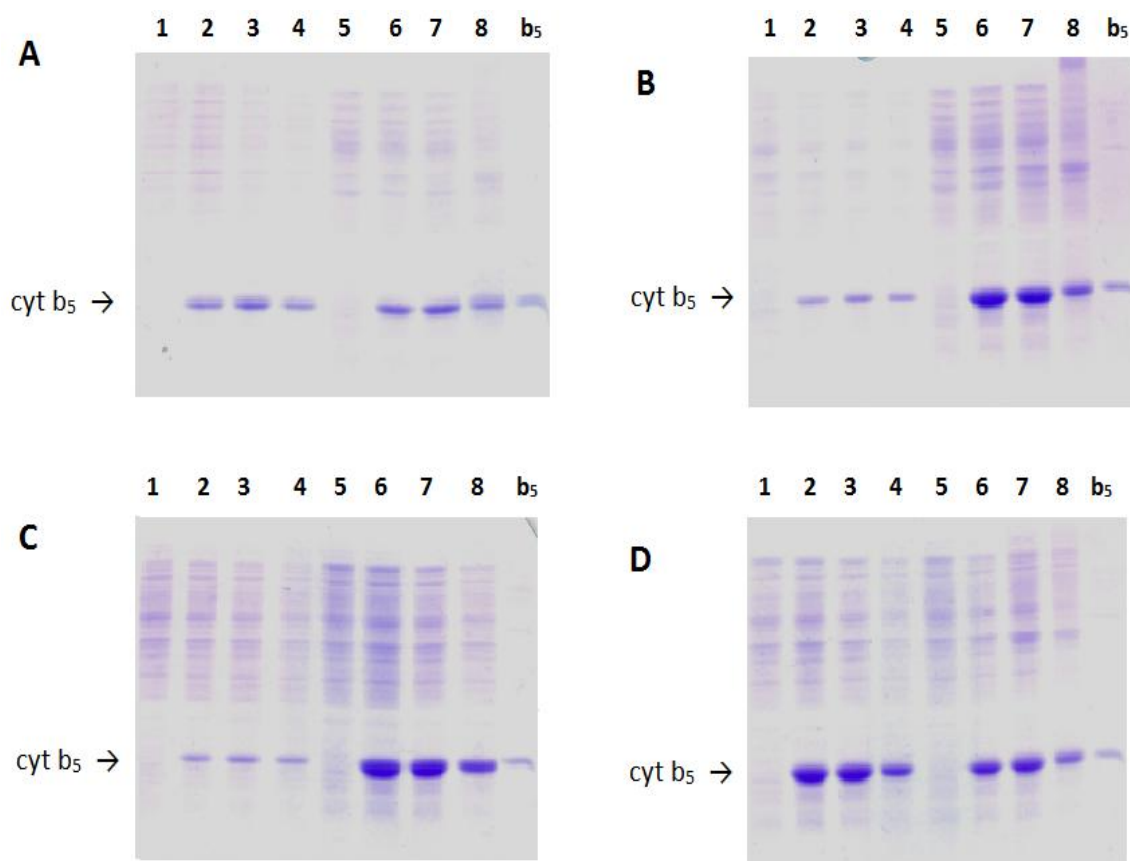
4.1. Optimalizace produkce cytochromu b_5

Nejprve byl sledován vliv typu media na produkci cyt b_5 v expresním systému. Porovnávání produkce bylo prováděno (postupem popsaným v kapitole 3.6.6.2.) v LB mediu, DMEM doplněném o L-glutamin a DMEM-LM doplněném L-methioninem a D,L-leucinem ($V = 25$ ml). Produkce byla srovnávána pomocí elektroforesy ve vzorcích odebraných po 2, 4 a 24 hod. Vzorky byly ředěny na přibližně stejný počet buněk (absorbance při 600 nm byla v rozmezí 0,240 - 0,245). Z obr. 12 je patrné, že v LB mediu je produkce vyšší než v DMEM a DMEM-LM a také, že v LB mediu dochází ke zvýšení produkce i po 2. hod. s maximem po 4.hod., kdežto v DMEM a DMEM-LM je maximální produkce dosaženo už během 2. hod.



Obr. 12. Elektroforetické porovnání produkce cyt b_5 v různých mediích. Produkce cyt b_5 v LB mediu (A), DMEM (B) a DMEM-LM (C). STD - standard molekulových hmotností “wide range”, 1 - vzorek před indukcí IPTG, 2 - produkce po 2 hod., 3 - produkce po 4 hod., 4 - finální vzorek po 24 hod, b_5 - standard králíčího cyt b_5 ;

V dalším kroku bylo vyzkoušeno kombinované použití různých medií podle pracovního postupu, který je popsán v kapitole 3.6.2.2.. Obr. 13 na str. 42 znázorňuje výsledky elektroforesy, kterou byla produkce porovnávána. Vzorky byly opět ředěny na stejný počet buněk.



Obr. 13. Porovnávání produkce cyt b_5 v různých mediích. **A** - porovnání produkce cyt b_5 v LB mediu bez přidané δ -ALA (dráhy 1-4) a s přidanou δ -ALA (dráhy 5-8). **B** - srovnávání produkce v DMEM-LM bez přidané δ -ALA (1-4) a růst bakterií v LB mediu s následným převedením a produkcí v DMEM-LM s přidanou δ -ALA (5-8). **C** - srovnávání produkce v DMEM-LM bez přidané δ -ALA (1-4) a růst bakterií v DMEM s následným převedením a produkcí v DMEM-LM s přidanou δ -ALA (5-8). **D** - porovnávání produkce cyt b_5 v případě růst bakterií v DMEM s převedením do DMEM-LM bez přidané δ -ALA (1-4) s přidanou δ -ALA (5-8). 1 a 5 – vzorek před indukcí IPTG, 2 a 6 – produkce po 2 hod, 3 a 7 produkce po 4 hod, 4 a 8 – produkce po 24 hod, b_5 – standard králíčího cyt b_5

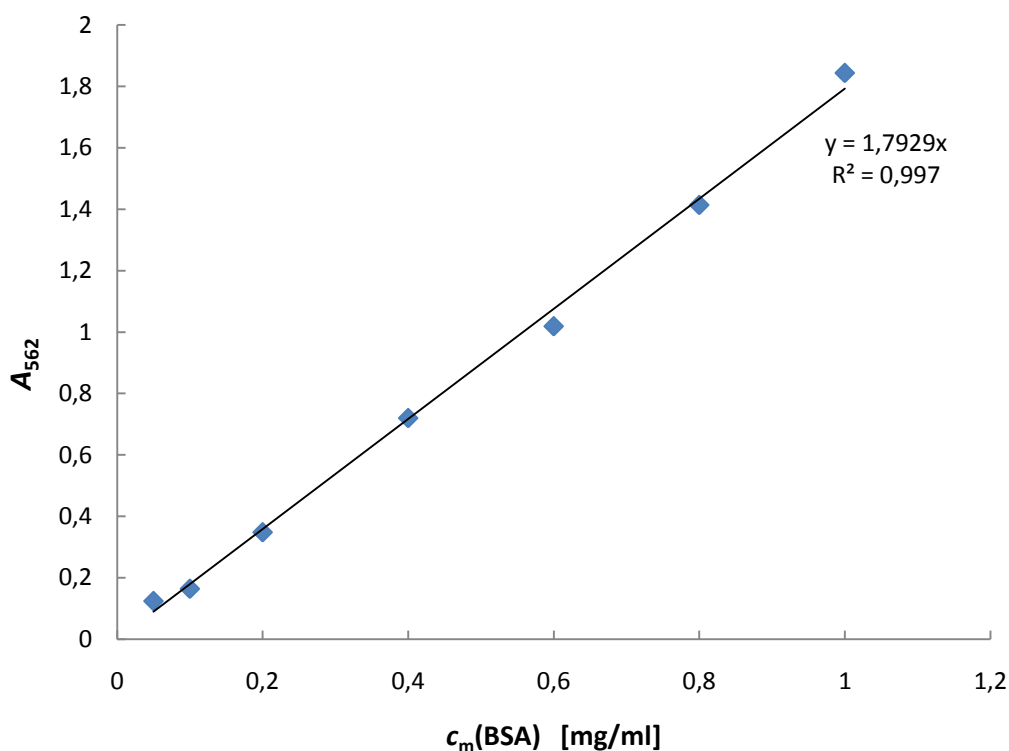
Podle obr. 2A a 2D nemá přítomnost δ -ALA výraznější vliv na produkci cyt b_5 . Produkce cyt b_5 vzrostla při počáteční kultivaci v LB mediu a následné produkci v DMEM-LM vůči kultivaci i produkci v DMEM-LM (2.B). Obdobný výsledek byl získán i při počáteční kultivaci v DMEM a produkci v DMEM-LM (2C). Z těchto výsledků bylo odvozeno, že pro zvýšení produkce cyt b_5 v DMEM-LM by měly být bakterie nejprve kultivovány v LB mediu nebo DMEM a produkce by měla být indukována až po převedení bakterií do DMEM-LM.

4.2. Izolace cytochromu b₅

4.2.1. Solubilizace cytochromu b₅

Pro studium inkorporace hemu do cyt b₅ byly produkce prováděny při 37 °C (vzorek 1), 27 °C (vzorek 2) a 20 °C (vzorek 3).

Sonikací a diferenční centrifugací byla získána membránová frakce z bakteriálních buněk *E. coli* (kapitola 3.6.3.1.). Pro solubilizaci membrán a uvolnění cyt b₅ bylo nutné stanovit koncentraci proteinů v membráně. Koncentrace proteinů ve vzorcích 1, 2 a 3 byla stanovena pomocí metody popsané v kapitole 3.3.1. Typická kalibrační křivka pro stanovení proteinů je zobrazena na obr. 14.



Obr. 14. Kalibrační křivka pro stanovení proteinů BCA

Koncentrace v membránových frakcích byly stanoveny z regresní rovnice kalibrační křivky (Tab. 1.).

Tab. 1. Stanovené hmotnostní koncentrace proteinů $c_m(p)$ v membránových frakcích

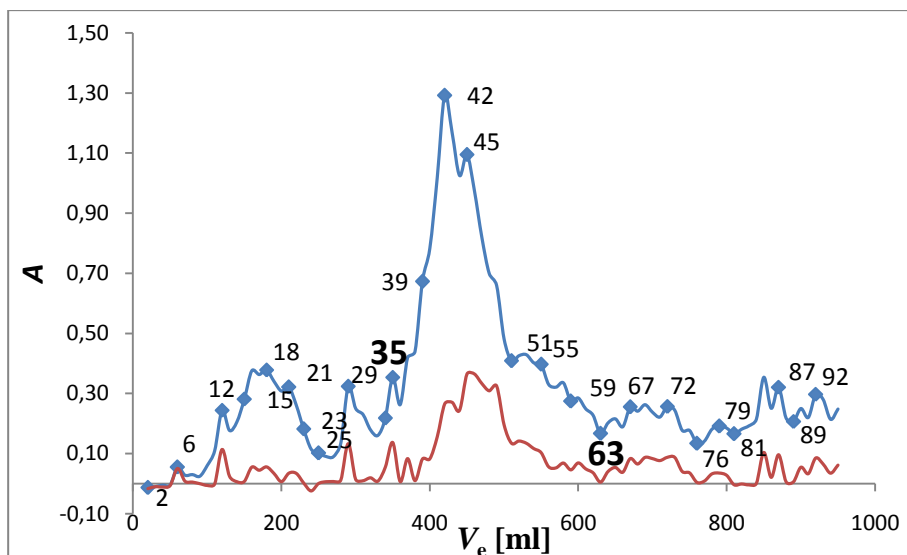
vzorek	$c_m(p)/\text{mg.ml}^{-1}$
1	7,9
2	9,7
3	7,8

Podle stanovené koncentrace proteinů bylo přidáno množství detergentů pro solubilizaci membrán.

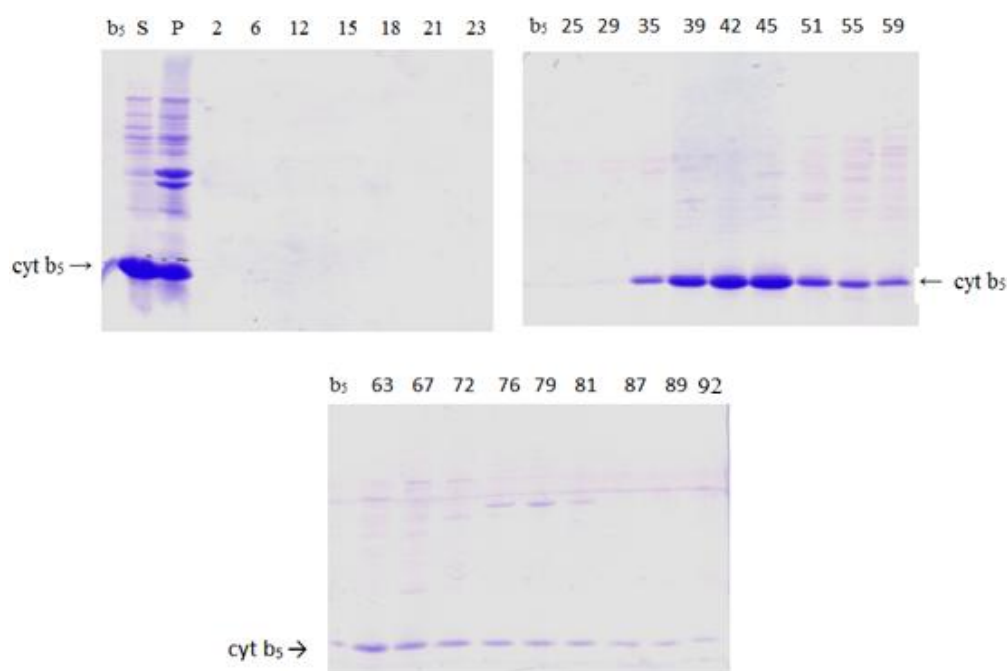
4.2.2. Chromatografie na koloně DEAE-Sepharosy CL6B

Chromatografie byla provedena podle postupu popsaného v kapitole 3.6.3.3.. V jednotlivých jímaných frakcích ($V = 10\text{ ml}$) byla měřena absorbance aromatických postraních řetězců aminokyselin při 280 nm a absorbance Soretova pásu hemoproteinu cyt b_5 při 413 nm.

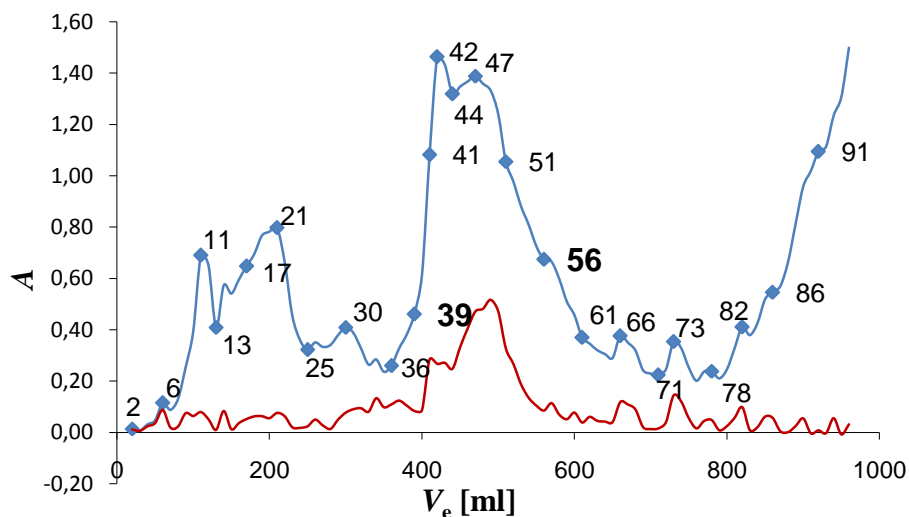
Cyt b_5 , který má izoelektrický bod 5,7, je při $\text{pH} = 7,7$ záporně nabitý, a proto se zachycuje na DEAE iontoměnič, který má opačný náboj. Proteiny, které byly za daných podmínek nabitě kladně, se na nosič nenavázaly a došlo tak k jejich odstranění. Navázaný cyt b_5 byl eluován lineárním gradientem 0 - 400 mM KCl (obr. 15, str. 45; obr. 17, str. 46 a obr. 19, str. 47). Eluční profily naznačují, že se cyt b_5 eluuje ve velkém množství frakcí. U vybraných frakcí byla provedena elektroforesa, aby byla zjištěna čistota a množství cyt b_5 ve frakcích (obr. 16, str. 45; obr. 18, str. 46 a obr. 20, str. 47).



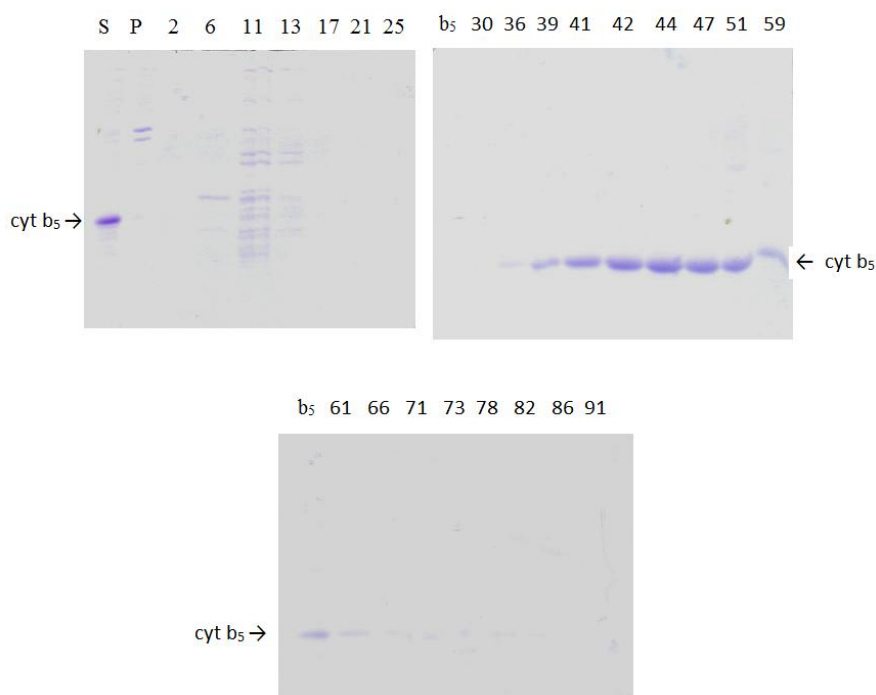
Obr. 15. Eluce cyt b_5 produkovaného při 37 °C lineárním gradientem KCl (0-400 mM). Modrá závislost zobrazuje absorbance při 280 a červená při 413 nm. Čísla udávají frakce použité na elektroforesu, pro přehlednost jsou uvedeny jen u závislosti při 280 nm.



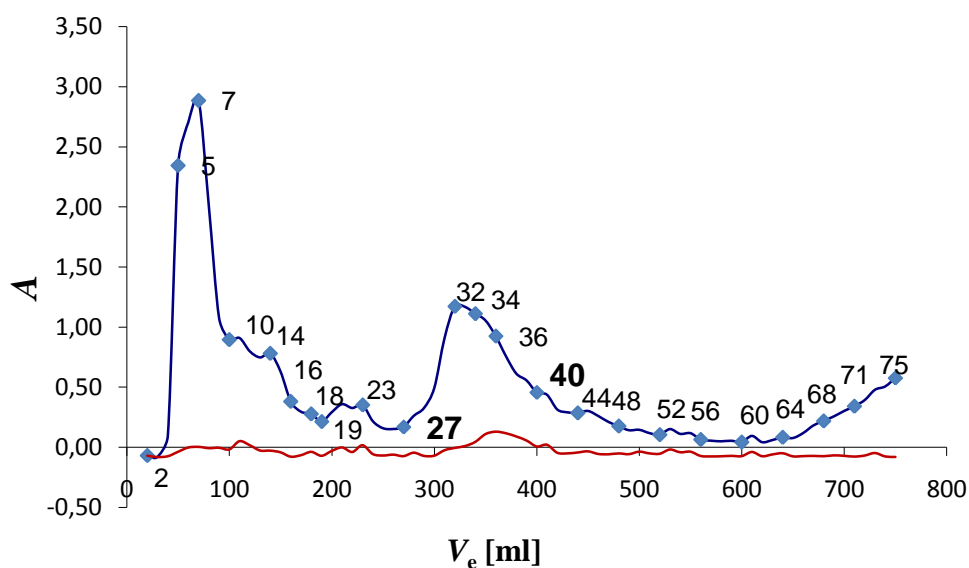
Obr. 16. Elektroforesa frakcí získaných elucí cyt b_5 produkovaného při 37 °C z DEAE-Sepharosy. Vzorky byly připraveny smísením 3 dílů vzorku frakce a 1 dílu 4 x koncentrovaného vzorkového pufru. Čísla označují frakce, které byly vybrány podle elučního profilu na obr. 15. S – supernatant po solubilizaci, P – peleta po solubilizaci, b_5 – standard králíčího cyt b_5



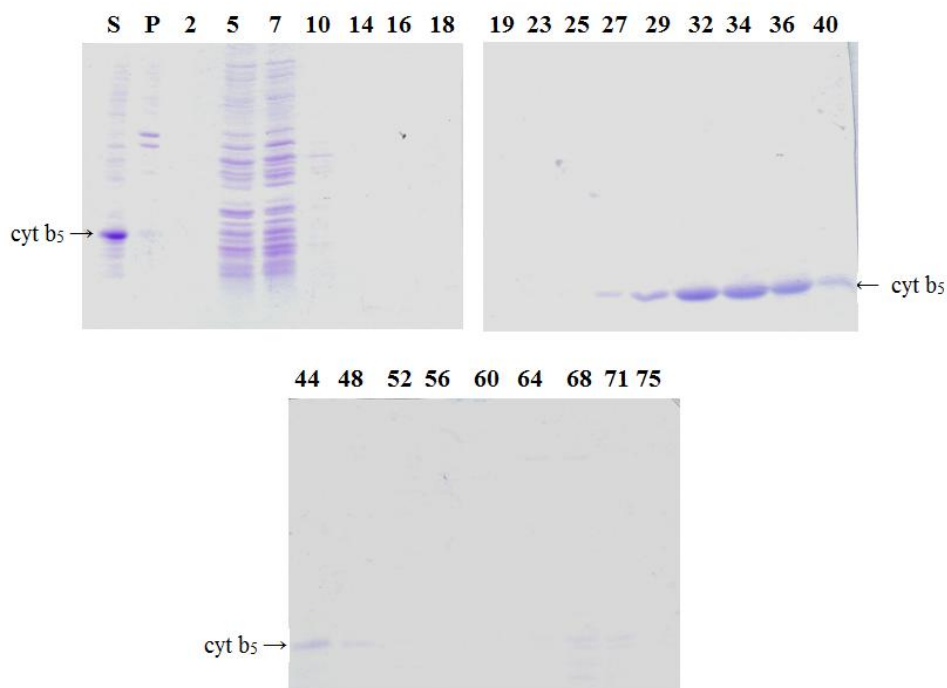
Obr. 17. Eluce cyt b_5 produkovaného při 27 °C lineárním gradientem KCl (0-400 mM). Modrá závislost zobrazuje absorbance při 280 a červená při 413 nm. Čísla udávají frakce použité na elektroforesu, pro přehlednost jsou uvedeny jen u závislosti při 280 nm.



Obr. 18. Elektroforesa frakcí získaných elucí cyt b_5 produkovaného při 27 °C z DEAE-Sepharosy. Vzorky byly připraveny smísením 3 dílů vzorku frakce a 1 dílu 4 x koncentrovaného vzorkového pufru. Čísla označují frakce, které byly vybrány podle elučního profilu na obr. 17. S – supernatant po solubilizaci, P – peleta po solubilizaci, b_5 – standard králíčího cyt b_5



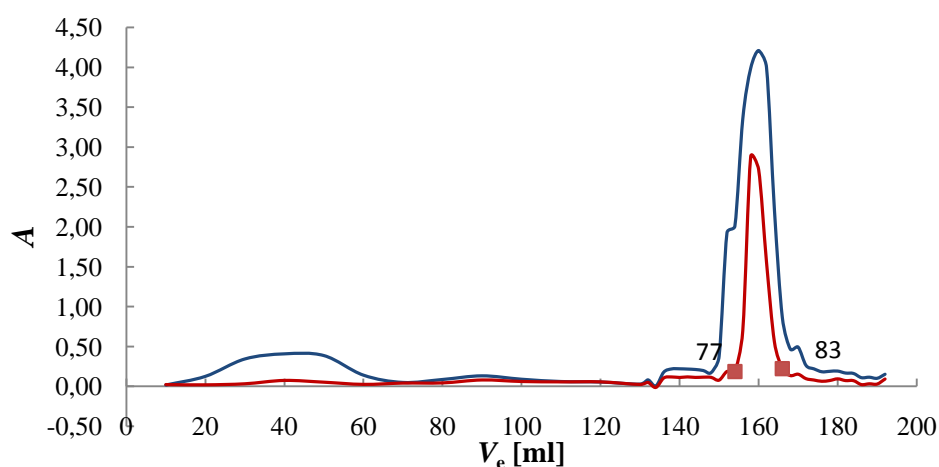
Obr. 19. Eluce cyt b_5 produkovaného při 20 °C lineárním gradientem KCl (0-400 mM). Modrá závislost zobrazuje absorbance při 280 a červená při 413 nm. Čísla udávají frakce použité na elektroforesu, pro přehlednost jsou uvedeny jen u závislosti při 280 nm.



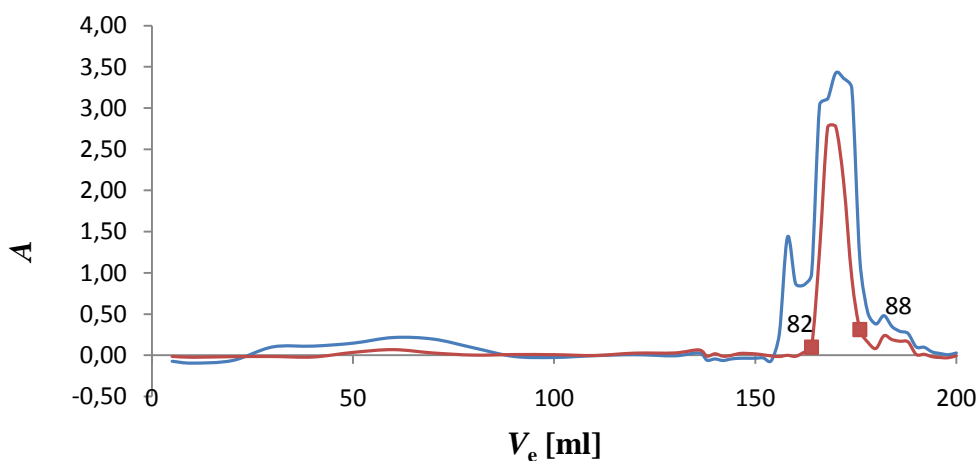
Obr. 20. Elektroforesa frakcí získaných elucí cyt b_5 produkovaného při 20 °C z DEAE-Sepharosy.. Vzorky byly připraveny smísením 3 dílů vzorku frakce a 1 dílu 4x koncentrovaného pufru. Čísla označují frakce, které byly vybrány podle elučního profilu na obr. 19. S – supernatant po solubilizaci, P – peleta po solubilizaci

Frakce, které se vyznačovaly absorbancí minimálně 10 % z maximální hodnoty absorbance při 413 nm a na elektroforese obsahovaly majoritní zónu cyt b_5 s minimem příměsí, byly spojeny. U produkce cyt b_5 při 37 °C byly spojeny frakce 35 – 63, při 27 °C frakce 39 - 56 a při 20 °C frakce 37 - 40. Spojené frakce byly zahuštěny na 30 ml a dialyzovány.

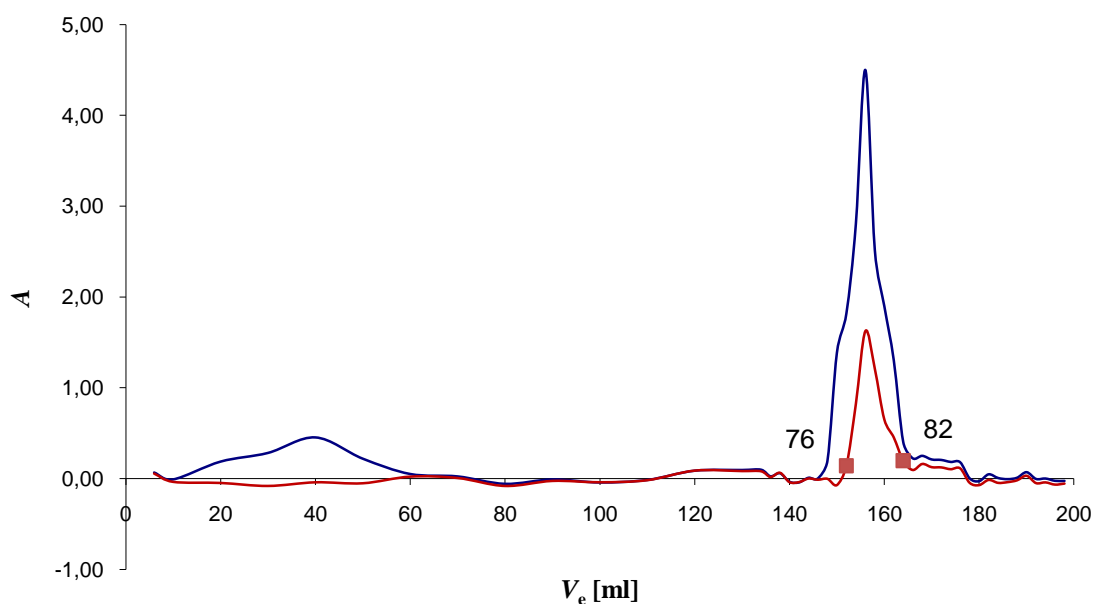
Detergent Brij 35 byl odstraněn rechromatografií na stejném nosiči. Eluce cyt b_5 byla prováděna izokraticky 200 mM KCl (obr. 21, 22 a obr. 23, na str. 49).



Obr. 21. Izokratická eluce cyt b_5 produkovaného při 37 °C z kolony DEAE-Sepharosy. Modrá závislost zobrazuje absorbance při 280 a červená při 413 nm. Vyznačená čísla frakcí udávají rozmezí frakcí, které byly spojeny.



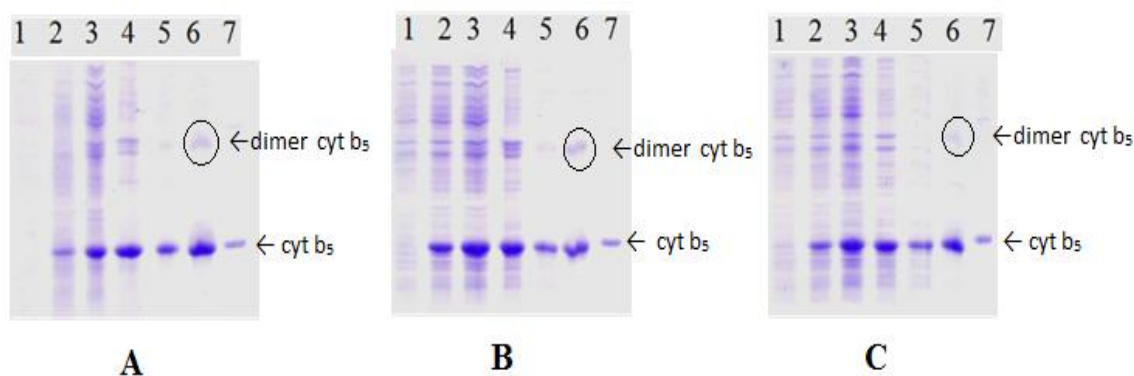
Obr. 22. Izokratická eluce cyt b_5 produkovaného při 27 °C z kolony DEAE-Sepharosy. Modrá závislost zobrazuje absorbance při 280 a červená při 413 nm. Vyznačená čísla frakcí udávají rozmezí frakcí, které byly spojeny.



Obr. 23. Izokratická eluce cyt b_5 produkovaného při 20 °C z kolony DEAE-Sepharosy. Modrá závislost zobrazuje absorbance při 280 a červená při 413 nm. Vyznačená čísla frakcí udávají rozmezí frakcí, které byly spojeny.

Pro následující dialýzu a zahuštění byly spojeny frakce minimálně s 10 % hodnotou maximální absorbance při 413 nm. U produkce cyt b_5 při 37 °C byly spojeny frakce 77 - 83 (eluční objem 154 – 166 ml), při 27 °C frakce 82 - 88 (eluční objem 164 – 176 ml) a při 20 °C frakce 76 - 82 (eluční objem 152 – 164). Spojené frakce ($V = 12$ ml) byly zahuštěny na výsledný objem 2 ml (finální preparát) a byla u nich stanovena koncentrace proteinu metodou BCA (4.3.1.)

Průběh izolace (obr. 24., str. 50) byl sledován pomocí elektroforesy (kapitola 3.5.). Solubilizací se z membrán uvolnilo pouze malé množství jiných membránových proteinů a cyt b_5 byl už relativně homogenní po solubilizace. Finální preparát (dráh 6 na obr. 22) ve všech případech obsahoval další protein s vyšší molekulovou hmotností. Tento protein byl identifikován technikou MALDI-TOF jako dimer cyt b_5 . Identifikace byla provedena RNDr. Miroslavem Šulcem, PhD (Mikrobiologický ústav AV ČR).



Obr. 24. Průběh izolace cyt b_5 , který byl produkován při teplotách 37 °C (A), 27 °C (B) a 20°C (C). 1 - vzorek před indukcí IPTG (5 x zředěný), 2 – homogenát *E. coli* buněk produkujících cyt b_5 (5 x zřed.), 3 – supernatant po sonikaci bakterií *E.coli* (10 x zřed.), 4 – membránová frakce (10 x zřed.), 5 – supernatant po solubilizaci (10 x zřed.), 6 – finální preparát cyt b_5 po chromatografii (50 x zřed.), 7 – standard kraličího cyt b_5

4.2.3. Charakterizace finálních preparátů cytochromu b_5

4.2.3.1. Stanovení koncentrace proteinů

Koncentrace byla stanovena pomocí metody popsané v kapitole 3.3.1. a hodnoty koncentrací jsou uvedeny v Tab. 2.

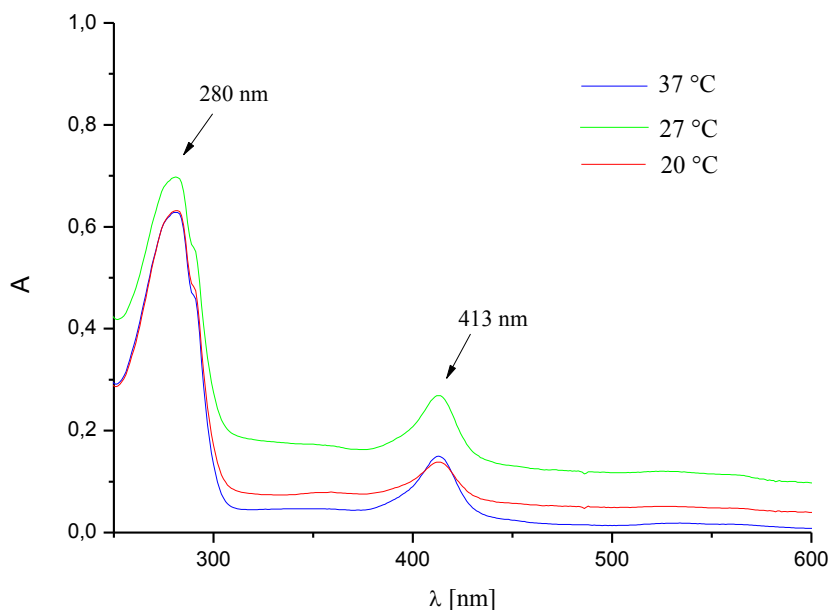
Tab. 2. Stanovené koncentrace cytochromu b_5 , který byl produkován při teplotách 37, 27 a 20 °C

Vzorek	$c_m(b_5) / \text{mg.ml}^{-1}$	$c(b_5) / \mu\text{mol.l}^{-1}$	$m(b_5) / \text{mg}^*$
1	20,72	1350	41,44
2	16,87	1099	33,56
3	15,9	938	31,8

Vzorky 1, 2 a 3 označují finální preparáty, které byly získány produkcí cyt b_5 při 37, 27, 20 °C a následnou izolací. $c_m(b_5)$ – hmotnostní koncentrace cyt b_5 ; $c(b_5)$ – molární koncentrace cyt b_5 ; * hmotnost vztažená na objem media, v případě vzorku A bylo množství proteinu získáno z produkce v 500 ml media a u vzorků 2 a 3 ze 430 ml media

4.2.3.2. Spektrofotometrická charakterizace cytochromu b_5

U finálních preparátů byla proměřena absolutní absorpční spektra (obr. 25.). V absorpčních spektrech se objevuje charakteristické maximum při 413 nm pro cyt b_5 a charakteristické maximum při 280 nm pro aromatické postranní řetězce aminokyselin apoproteinu b_5 .



Obr. 25. Absolutní absorpční spektra finálních preparátů cyt b_5 produkovaných při teplotách 37, 27 a 20 °C. Preparáty byly 50 x zředěny fosfátovým pufrům.

4.3. Inkorporace modifikované aminokyseliny do cyt b_5

Pro studium inkorporace modifikované aminokyseliny do cyt b_5 byla zvolena modelová aminokyselina d_3 -methyl-L-methionin (D_3 -Met). Tato aminokyselina byla do kultivačního media přidávána po 20 min od převedení bakterií do limitního media (DMEM-LM), aby bakterie stačily vyčerpat zásoby nemodifikované aminokyseliny a zabudovávaly do proteinu jen modifikovanou aminokyselinu.

Inkorporace d_3 -methyl-L-methioninu ve finálních preparátech byla potvrzena hmotnostní spektrometrií MALDI-TOF (“matrix assisted laser desorption ionization-time of flight”) RNDr. Miroslavem Šulcem, PhD.

Exprimovaný cyt b₅ byl nejprve proteolyticky štěpen trypsinem a endoproteasou Lys-C. Pokrytí sekvence bylo v případě trypsinu 60 % a Lys-C 52 % a peptidy s d₃-methyl-L- methioninem nebyly v těchto případech nalezeny. Pro další štěpení byl použit chymotrypsin, po jehož aplikaci se podařilo identifikovat peptidy s pokrytím sekvence cyt b₅ z 97 % (obr. 26.). Po proteolýze chymotrypsinem byly hmotnostní spektrometrií MALDI-TOF nalezeny 3 peptidy, které obsahovaly d₃-methyl-L-methionin (Tab.3, str. 53). Nalezené peptidy měly experimentální hodnotu m/z o 3 větší než je teoretická hodnota m/z, což potvrzuje inkorporaci d₃-methyl-L- methioninu, který má místo 3 atomů vodíku 3 atomy deuteria. V primární sekvenci králíčího cyt b₅ se vyskytují 4 methioniny. Ze srovnání primární sekvence cyt b₅ a sekvence nalezených peptidů cyt b₅ vyplývá, že byly inkorporovány 3 d₃-methyl-L-methionin ze 4 možných. Inkorporaci čtvrtého N-terminálního methioninu nelze potvrdit, protože byl pravděpodobně odštěpen v průběhu produkce.

Trypsin, pokrytí sekvence 60%

1 MAAQSDKDKV **K** **Y**TTLEEIKKH **K** **N**HSKSTWLIL **H**HKVYDLTKF **L**EEHPGGEEV
51 **L**REQAGGDAT **E**NFEDVGHST **D**ARELSKTFI **I**GELHPDDRS **K**LSKPMETLI
101 TTVDSNSSWW TNWVIPAISA LIVALMYRLY MADD

LysC, pokrytí sekvence 52%

1 MAAQSDKDKV **K** **Y**TTLEEIKKH **N**HSK**S**TWLIL **H**HKVYDLTKF **L**EEHPGGEEV
51 **L**REQAGGDAT **E**NFEDVGHST **D**ARELSKTFI **I**GELHPDDRS **K**LSKPMETLI
101 TTVDSNSSWW TNWVIPAISA LIVALMYRLY MADD

Chymotrypsin, pokrytí sekvence 97%

1 MAAQSDKDKV **K** **Y**TTLEEIKKH **N**HSKSTWLIL **H**HKVYDLTKF **L**EEHPGGEEV
51 **L**REQAGGDAT **E**NFEDVGHST **D**ARELSKTFI **I**GELHPDDRS **K**LSKPMETLI
101 **T**TVDSNSSWW TNW**V**IPAISA LIVALMYRLY MADD

Obr. 26. Pokrytí sekvence při hmotnostní analýze štěpů rekombinantního cyt b₅. Technikou MALDI-TOF byly proměřeny směsi peptidů po proteolýze cyt b₅ trypsinem, endoproteasou Lys-C, nebo chymotrypsinem. Obrázek byl poskytnut RNDr. Miroslavem Šulcem, PhD.

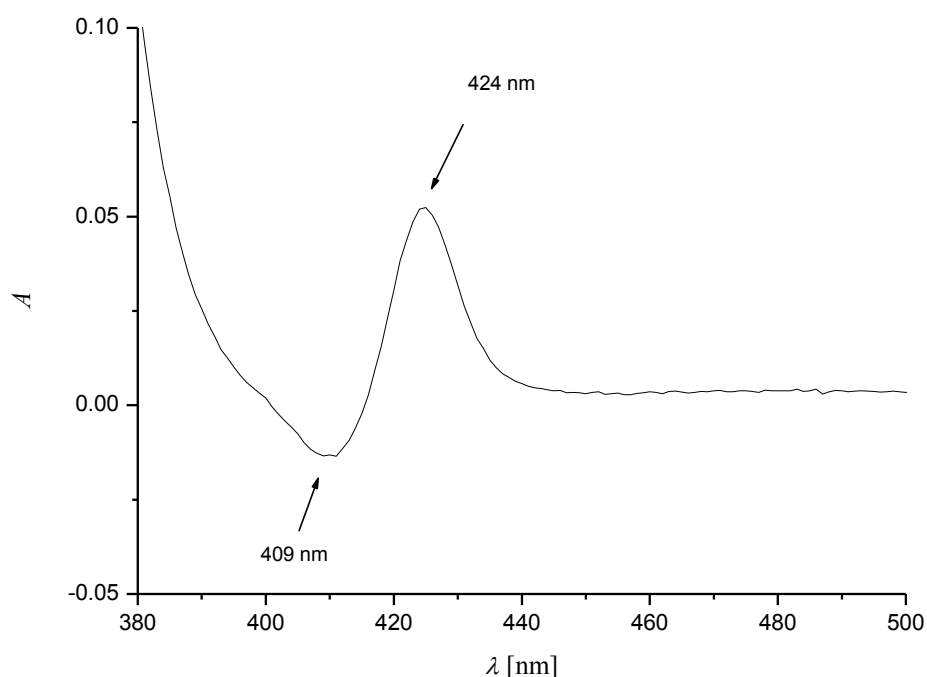
Tab. 3. Výsledky analýzy inkorporace D3-Met do exprimovaného rekombinantního cyt b₅ pomocí MALDI-TOF po proteolýze vzorků chymotrypsinem.

Vzorek	Sekvence CYB5_RABIT		Teoretická hodnota m/z	Experimentální hodnota m/z	Chyba [ppm]
kontrola/37 °C	126-130ox	<u>M</u> YRLY	761.3650	761.376	14
D3-Met/27 °C			764.3839	764.390	8
kontrola/37 °C	128-134ox	RLY <u>M</u> DD	899.3927	899.407	16
D3-Met/27 °C			902.4115	902.425	5
kontrola/37 °C	2-12	AAQSDKDVKYY	1287.6215	1287.643	17
D3-Met/27 °C			1287.6215	1287.630	7
kontrola/37 °C	80-110ox	IIGELHPDDRSKP <u>M</u> ETLIT	3571.7737	3571.838	18
D3-Met/27 °C			3574.7925	3574.837	12

Vzorky byly analyzovány hmotnostním spektrometrem MALDI-TOF Ultraflex III (Bruker Daltonics) v pozitivním reflektroновém modu v rozsahu hodnot m/z 700 – 6000. Sekvence všech prezentovaných peptidů byla potvrzena MS/MS fragmentací (RNDr. Miroslav Šulc, PhD.).

4.4. Studium inkorporace hemu při produkci cytochromu b₅

Z absolutních absorpčních spekter (obr. 25., str. 51) a diferenčních spekter (obr. 27., str. 54) byla pomocí molárních absorpčních koeficientů určena koncentrace cyt b₅ a apoproteinů ve finálních preparátech cyt b₅, které byly produkovány při 37 , 27 a 20 °C (postup v kapitole 3.3.2.1. a 3.3.2.2.). Z koncentrací bylo vypočteno procentuální zastoupení cyt b₅ ve finálních preparátech (Tab. 4, str. 54). Původní produkce byla prováděna při teplotě 37 °C. Snížením teploty se inkorporace hemu během produkce zvýšila o 25 %. Dalším snížením teploty na 20 °C se inkorporace hemu nezvýšila, naopak inkorporace poklesla o 40 % vůči produkci při 37 °C.



Obr. 27. Příklad diferenčního spektra cyt b_5 . Bylo proměřeno spektrum redukované formy cyt b_5 (redukováno dithioničitanem sodným) oproti formě oxidované.

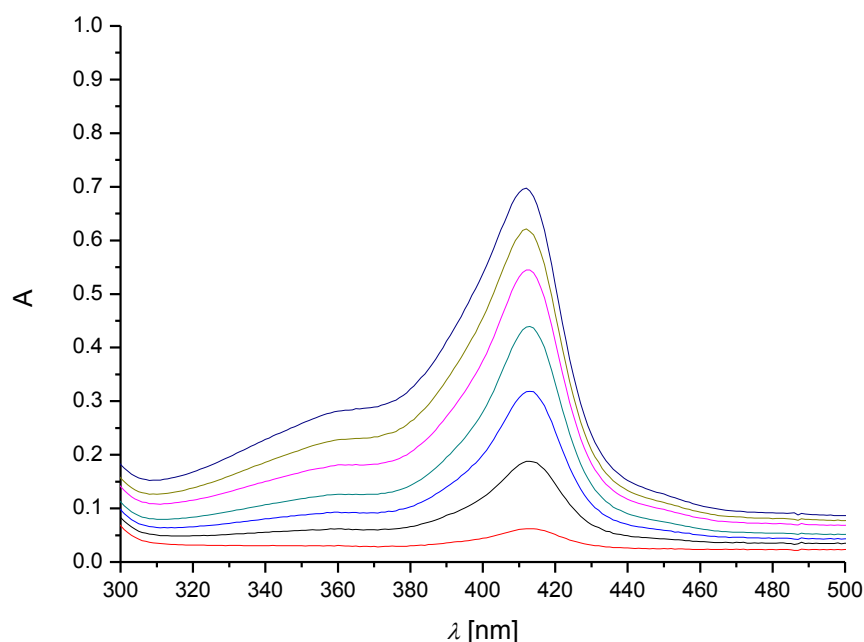
Tab. 4. Hodnoty koncentrací proteinů ve finálních preparátech a procentuální zastoupení cyt b_5 .

vzorek	$c_p/\mu\text{M}$	$c_{b_5}(\text{A})/\mu\text{M}$	$c_{b_5}(\text{D})/\mu\text{M}$	$\bar{c}_{b_5}/\mu\text{M}$	$c_{\text{apo-}b_5}/\mu\text{M}$	$c_{b_5}/\%$
1	975,4	58,14	59,12	58,63	916,8	6,0
2	888,7	64,59	68,03	66,31	822,4	7,5
3	939,9	37,94	30,27	34,11	905,8	3,6

Vzorky 1, 2 a 3 označují finální preparáty, které byly získány produkcí cyt b_5 při 37, 27, 20 °C a následnou izolací. Koncentrace proteinů (c_p) a cyt b_5 ($c_{b_5}(\text{A})$) byly vypočteny z absolutních absorpčních spekter (postupem popsáním v kapitole 3.3.2.1.) finálních preparátů. Koncentrace $c_{b_5}(\text{D})$ byly vypočteny z diferenčních spekter (postupem popsáním v kapitolách 3.3.2.2.) finálních preparátů. Koncentrace cyt b_5 vypočtené z absolutních absorpčních a diferenčních spekter byly zprůměrovány (\bar{c}_{b_5}) a použity k výpočtu procentuálního zastoupení cyt b_5 z celkového množství proteinů. Odečtením průměrné koncentrace cyt b_5 od koncentrace proteinů byla získána koncentrace apo-cyt b_5 ($c_{\text{apo-}b_5}$).

4.5. Rekonstituce apo-cytochromu b_5 s hemem

Změnou teploty při produkci na 27 °C bylo dosaženo zvýšení inkorporace o 25 %, ale celkové zastoupení cyt b_5 bylo stále minoritní (7,5 %). Pro získání, co největšího množství funkčního holoproteinu byla vyzkoušena metoda inkorporace hemu do apo-cyt b_5 postupným přidáváním roztoku heminu (kapitola 3.4.). Přidáváním roztoku heminu narůstá absorpční maximum při 413 nm, což svědčí o rekonstituci cyt b_5 (obr. 28). Přidávání bylo ukončeno, když absorbance při 385 nm výrazně vzrostla, což znamenalo přítomnost volného heminu.



Obr. 28. Inkorporace hemu do apo-cyt b_5 . Jednotlivé absorpční spektra odpovídají přídatku 5 μ l 0,1 mM heminu.

5. Diskuse

Inkorporaci modifikovaných aminokyselin do cyt b_5 lze využít při studiu protein-proteinových interakcí a přispět tak k objasnění vzájemného uspořádání proteinů v monooxygenasovém systému a mechanismu působení cyt b_5 . V této práci byl použit bakteriální kmen *E. coli* BL-21 (DE3) k heterologní expresi modifikovaného cyt b_5 . Předpokladem pro expresi modifikovaného cyt b_5 bylo využití podobnosti modifikovaných aminokyselin se základními proteinovými aminokyselinami a nižší selektivita methionin-tRNA synthetasy. Pro produkci proteinu s modifikovanými aminokyselinami musí být pro zamezení kompetice s nemodifikovanými aminokyselinami použito tzv. limitní medium (DMEM-LM), které neobsahuje aminokyseliny určené pro záměnu jejich deriváty v našem případě L-leucin a L-methionin. V limitní medium dochází k redukci produkce cyt b_5 oproti kompletnímu mediu⁹⁴. Pro zvýšení produkce cyt b_5 bylo vyzkoušeno kombinované použití různých médií. Zvýšení produkce se podařilo dosáhnout, když byly bakterie nejprve kultivovány v LB mediu nebo DMEM a produkce byla indukována až v DMEM-LM. Z těchto výsledků bylo odvozeno, že pro zvýšení produkce cyt b_5 v DMEM-LM by měly být bakterie nejprve kultivovány v LB mediu nebo DMEM a produkce by měla být indukována až po převedení bakterií do DMEM-LM. Tento požadovaný efekt na produkci cyt b_5 je možné vysvětlit novým přísunem aminokyselin z limitního media, protože při kultivaci buněk do dosažení optické density okolo 1 může docházet k vyčerpání aminokyselin a ke snížení produkce. Maximální produkce bývá dosaženo do 4 hod. po indukci exprese cyt b_5 IPTG. Přítomnost δ -ALA nemá výraznější vliv na produkci cyt b_5 .

Produkcí cyt b_5 při 37 °C bylo získáno pouze 6 % holoproteinu a 94 % apoproteinu. Podobné výsledky byly popsány i v jiných studiích⁹⁸⁻¹⁰⁰, kdy apo-formě odpovídalo přibližně 90 % z celkového množství cyt b_5 . Nízký obsah hemu v rekombinantním proteinu může být vysvětlen vysokou expresí apoproteinu během krátkého časového úseku a nedostatečnou syntésou hemu v buňkách⁹⁹. V souvislosti s inkorporací hemu byl v této práci zkoumán vliv teploty na inkorporaci hemu. Při snížení teploty z 37 °C na 27 °C se inkorporace hemu zvýšila o 25 %. Dalším snížením teploty na 20 °C inkorporace hemu poklesla o 40 % oproti produkci při 37 °C. Podle dostupné literatury lze poměr holoprotein/apoprotein regulovat i množstvím přidaného IPTG^{98,99}. Nižší koncentrací IPTG lze dosáhnout poměru obou forem téměř 1:1, ale nižší koncentraci IPTG odpovídá i snížení produkce proteinu⁹⁹. Optimální by mělo být použití 2 – 10 μ M IPTG, záleží na

druhu bakteriálního kmenu a na expresním vektoru. Vyšší exprese holoproteinu bývá přisuzována pomalejší synthese apoproteinu, která může poskytnout dostatečný čas na syntesu hemu. Teoreticky by biosynthesa hemu měla být v buňce řízena zpětnou vazbou a při větší expresi apoproteinu, by měla být vyšší i biosynthesa hemu ¹⁰¹. Ale při vysoké rychlosti exprese proteinu obsah hemu v buňce klesá, což může být vysvětleno kompeticí při synthese hemu a apoproteinu o aminokyseliny ⁹⁹.

Protože nebyl vliv teploty na inkorporaci hemu příliš znatelný, byl apoprotein rekonstituován s hemem. Při rekonstituci byl apo-cyt b₅ titrován roztokem heminu. Nevýhodou této metody byla nepřesnost při určení bodu ekvivalence, kdy byl téměř veškerý apo-cyt b₅ rekonstituován s hemem. Pro odstranění nadbytku heminu by bylo vhodné rekonstituovaný cyt b₅ dialyzovat. Rekonstituci apo-cyt b₅ je možné realizovat i během izolace ⁹⁸. Po sonikaci buněk se odebere vzorek a určí se množství heminu potřebného k rekonstituci. Příslušné množství heminu se přidá k sonikovaným buňkám a nadbytečným hemin bude odstraněn při chromatografii a dialýze v průběhu izolace.

Inkorporace modelové deuterované aminokyseliny byla potvrzena hmotnostní spektrometrií. Nebyly nalezeny žádné nedeuterované peptidy a lze říci, že záměna aminokyselin probíhá zcela. Tyto výsledky budou vzaty jako podklad pro inkorporaci fotolabilních aminokyselin

6. Shrnutí a závěr

Výsledky získané v této práci lze shrnout následovně:

- Byly optimalizovány podmínky pro maximální produkci cyt b_5 v tzv. limitním mediu (DMEM-LM). Bakteriální buňky musí být kultivovány nejprve v LB mediu nebo DMEM a produkce cyt b_5 indukována až po převedení do DMEM-LM. Maximální produkce je dosaženo do 4 hodin po indukci při 37 °.
- Hmotnostní spektrometrií byla potvrzena inkorporace modelové deuterované aminokyselin do cyt b_5 , která proběhla zcela.
- Byly izolovány preparáty cyt b_5 , které byly produkovány při různých teplotách a byl určen vliv teploty na inkorporaci hemu. Produkci cyt b_5 při 37 °C bylo získáno 6 % holoproteinu. Snížením teploty z 37 °C na 27 °C se inkorporace hemu zvýšila o 25 %. Dalším snížením teploty na 20 °C inkorporace hemu poklesla o 40 % oproti produkci při 37 °C. Změnou teploty produkce nelze dosáhnout výrazného zvýšení poměru holoprotein/apoprotein.
- Apo-cyt b_5 lze rekonstitucí s hemem převést na holoprotein cyt b_5 .

Seznam použité literatury

1. Knejzlík, Z., Káš, J., Ruml, T.: *Chem. Listy*, 94, 913-917 (2000)
2. Stiborová, M., Hudeček, J., Hodek, P., Frei, E.: *Chem. Listy*, 93, 229-237 (1999)
3. Stiborová, M.: Biochemie II, přednáška na PřF UK, Praha, katedra biochemie (2009)
4. Klingerbenberg, M.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 75, 376-386 (1958)
5. Garfinkel, D.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 77, 493-509 (1958)
6. Omura, T., Sato, R.: *J. Biol. Chem.*, 237, 1375-1376 (1962)
7. Omura, T., Sato, R.: *J. Biol. Chem.*, 239, 2379-2385 (1964)
8. Ioannides, C., Lewis, D.F.: *Curr. Top. Med. Chem.*, 4, 1767-1788 (2004)
9. Anzenbacher, P., Anzenbacherová, E.: *Cell. Mol. Life Sci.*, 58, 737-747 (2001)
10. Stiborová, M., Hudeček, J., Páca, J.Jr., Martínek, V., Páca, J.: *Chem. Listy* 98, 876-890 (2004)
11. Black, S.D.: *FASEB J.*, 6, 680-685 (1992)
12. Nerbert, D.W., Russell, D.W., *Lancet*, 360, 1155-1162 (2002)
13. Chromá, L., Macková, M., Macek, T., Martínek, V., Stiborová, M.: *Chem. Listy*, 95, 212-222 (2001)
14. <http://metallo.scripps.edu/promise/P450.html#reaction> (10.7.2010)
15. Wang, M., Roberts, D.L., Paschke, R., Shea, T.M., Masters, B.S., Kim, J.J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 8411-8416 (1997)
16. Vermilon, J. L., Ballou, D. P., Massey, V., Coon, M. J.: *J. Biol. Chem.*, 256, 266-277 (1981)
17. Oprian, D.D., Coon, M.J.: *J. Biol. Chem.*, 257, 8935-8944 (1982)
18. Porter T.D.: *J. Biochem. Mol. Toxicol.*, 16, 311-316 (2002)
19. Strittmatter P., Velick S.F.: *J. Biol. Chem.*, 221, 253-264 (1956)
20. Velick S.F., Strittmatter P.: *J. Biol. Chem.*, 221, 265-275 (1956)
21. Vergères, G., Waskell, L.: *Biochimie*, 77, 604-620 (1995)
22. Clarke, T.A., Im, S.C., Bidwai, A., Waskell, L.: *J. Biol. Chem.*, 279, 36809-36818 (2004)
23. Schenkman, J. B., Jansson, I.: *Pharmacol. Ther.*, 97, 139-152 (2003)
24. Lee, T.C., Baker, R.C., Stephens, N., Snyder, F.: *Biochem. Biophys. Acta*, 489, 25-31 (1977)

25. Strittmatter, P., Spatz, L., Corcoran, D., Roger, M.J., Setlow, B., Redline, R.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 71, 4565-4569 (1974)
26. Paltauf, F., Prough, R., Masters, B., Johnson, J.: *J. Biol. Chem.*, 249, 2661-2662 (1974)
27. Grinstead, G.F., Gaylor, J.L.: *J. Biol. Chem.*, 257, 13937-13944 (1982)
28. Hultquist, D. E., Passon, P. G.: *Nat. New Biol.*, 229, 252-254 (1971)
29. Mathews, F.S., Levin, e M., Argos, P.: *J. Mol. Biol.*, 64, 449-464 (1972)
30. Muskett, F.W., Kelly, G., Whitford, D.: *J. Mol. Biol.*, 258, 172-189 (1996)
31. Mukhopadhyay, K., Lecomte, J.T.J.: *Biochemistry*, 43, 12227-12236 (2004)
32. Falzone, C.J., Mayer, M.R., Whiteman, E.L., Moore, C.D., Lecomte, J.T.: *Biochemistry*, 35, 6519-6526 (1996)
33. Kotrbová, V., Aimová, D., Ingr, M., Bořek-Dohalská, L., Martínek, V., Stiborová, M.: *Protein Expr. Purif.*, 66, 203-209 (2009)
34. Pfeil, W.: *Protein Sci.*, 2, 1457-1501 (1993)
35. Davis, R.B., Lecomte, J.T.J.: *Biopolymers*, 90, 544-555 (2008)
36. Chiang, J.Y.L.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 211, 662-673 (1981)
37. Guengerich F.P., Ballou D.P., Noc, M.J.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 70, 951-959 (1976)
38. Hildebrandt A., Estabrook R.W.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 143, 66-79 (1971)
39. Schenkman J.B., Jansson I.: *Drug Metab. Rev.*, 31, 351-356 (1999)
40. Reed, J.R., Hollenberg, P.F.: *J. Inorg. Biochem.*, 97, 265-275 (2003)
41. Schenkman, J.B., Voznesensky, A.I., Jansson, I.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 314, 234-241 (1994)
42. Yamazaki, H., Johnson, W.W., Ueng, Y.-F., Shimada, T., Guengerich F.P.: *J. Biol. Chem.*, 271, 27438-27444 (1996)
43. Gao, Q., Doneanu, C.E., Shaffe, r S.A., Adman, E.T., Goodlett, D.R., Nelson, S.D.: *J. Biol. Chem.*, 281, 20404-20417 (2006)
44. Jamakhandi, A.P., Kuzmic, P., Sanders, D.E., Miller, G.P.: *Biochemistry*, 46, 10192-10201 (2007)
45. Szczsna-Skopura, E., Kemper, B.: *J. Biol. Chem.*, 268, 1757-1762 (1993)
46. Shimozawa, O., Sakaguchi, M., Ogawa, H., Harada, N., Mihara, K., Omura, T.: *J. Biol. Chem.*, 268, 21399-21402 (1993)

47. Sakaguchi, M., Mihara, K, Sato, R.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 3361-3364 (1984)
48. High, S., Andersen, S.S.L., Görlich, D., Hartmann, E., Prehn, S., Rapoport, T.A., Dobberstein, B.: *J. Cell Biol.*, 121, 743-750 (1993)
49. Gullin, C: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 184, 1490-1495 (1992)
50. Pernecky, S.J., Olken, N.M., Bestervelt, L.L., Coon, M.J.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 318, 446-456 (1995)
51. Larson, J.R., Coon M.J., Porter, T.D.: *J. Biol. Chem.*, 266, 7321-7324 (1991)
52. Gum, J.R., Strobel, H.W.: *J. Biol. Chem.*, 254, 4177-4185 (1979)
53. Porter, T.D., Kasper, C.B.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 973-977 (1985)
54. Yabusaki, Y., Murakami, H., Ohkawa, H.: *J. Biochem.*, 103, 1004-1010 (1988)
55. Katagiri, M., Murakami, H., Yabusaki, Y., Sugiyama, T., Okamoto, M., Yamano, T., Ohkawa, H.: *J. Biochem.*, 100, 945-954 (1986)
56. Black, S.D., Coon, M.J.: *J. Biol. Chem.*, 257, 5929-5938 (1982)
57. Vergères, G., Waskell, L.: *J. Biol. Chem.*, 267, 12583-12591 (1992)
58. Ozols, J.: *Biochem. Biophys. Acta*, 997, 121-130 (1989)
59. Vergères, G., Yen, T.S.B., Aggeler, J., Lausier, J., Waskell, L., *J. Cell Sci.*, 106, 249-259 (1993)
60. Mitoma, J., Ito, A.: *Embo J.*, 11, 4197-4203 (1992)
61. Estabrook, R.W., Franklin, M.R., Cohen, B., Shigamatzu, A., Hildebrandt, A.G.: *Metabolism*, 20, 187-199 (1971)
62. Miwa, G.T., Lu, A.Y.H.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 234, 161-166 (1984)
63. Miwa, G.T., West, S.B., Huang, M.T., Lu, A.Y.H.: *J. Biol. Chem.*: 254, 5695-5700 (1979)
64. Gigon, P.L., Gram, T.E., Gillette, J.R.: *Mol. Pharmacol.*, 5, 109-122 (1969)
65. Peterson, J.A., Ebel, R.E., O'Keeffe, D.H., Matsubara, T., Estabrook, R.W.: *J. Biol. Chem.*, 251, 4010-4016 (1976)
66. Taniguchi, H., Imai, Y., Iyanagi, T., Sato, R.: *Biochim. Biophys. Acta*, 550, 341-356 (1979)
67. Taniguchi, H., Pyerin, W.: *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 114, 335-340 (1988)
68. Voznesensky, A.I., Schenkman J.B.: *J. Biol. Chem.*, 267, 14669-14676 (1992)
69. Voznesensky, A.I., Schenkman J.B.: *J. Biol. Chem.*, 269, 15724-15731 (1994)
70. French, J.S., Guengerich, F.P., Coon, M.J.: *J. Biol. Chem.*, 255, 4112-4119 (1980)

71. Stayton, P.S., Sligar, S.G.: *Biochemistry*, 29, 7381-7386 (1990)
72. Rodgers, K.K., Sligar, S.G.: *J. Mol. Biol.*, 221, 1453-1460 (1991)
73. Nisimoto, Y.: *J. Biol. Chem.*, 261, 14232-14239 (1986)
74. Shen, A.L., Kasper, C.H.B.: *J. Biol. Chem.*, 270, 27475-27480 (1995)
75. Shimizu, T., Tateishi, T., Hatano, M., Fujii-Kuriyama, Y.: *J. Biol. Chem.*, 266, 3372-3375 (1991)
76. Cvrk, T., Strobel, H.W.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 385, 290-300 (2001)
77. Strittmatter, P., Hackett, C.S., Korza G., Ozols, J.: *J. Biol. Chem.*, 265, 21709-21713 (1990)
78. Kawano, M., Shirabe, K., Nagai, T., Takeshita, M.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 245, 666-669 (1998)
79. Shirabe, K., Nagai, T., Yubusui, T., Takeshita, M.: *Biochim. Biophys. Acta*, 1384, 16-22 (1998)
80. Bando, S., Takano, T., Yubisui, T., Takeshita, M., Nakagawa, A.: *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, 60, 1939-1944 (2004)
81. Asada, T., Nagase, S., Nishimoto, K., Koseki, S.: *J. Mol. Liquids*, 147, 139-144 (2009)
82. Tamburini, P.P., White, R.E., Schenkman, J.B.: *J. Biol. Chem.*, 260, 4007-4015 (1985)
83. Myasoedova, K.N., Berndt, P.: *FEBS Lett.*, 270, 177-180 (1990)
84. Cawley, G.F., Batie, C.J., Backes, W.L.: *Biochemistry*, 34, 1244-1247 (1995)
85. Cawley, G.F., Zhang, S., Kelly, R., Backes, W.L.: *Drug Metab. Dispos.*, 29, 1529-1534 (2001)
86. <http://www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=CE4D6C5C-5946-4814-9904-C46E01232683> (7.8.2010)
87. Kubíčková B., Hodek P.: *Chem. Listy*, 95, 359-364 (2001)
88. Miernyk, J.A., Thelen, J.J.: *Plant J.*, 53, 597-609 (2008)
89. <http://www.piercenet.com/products/browse.cfm?fldID=DB013E61-5056-8A76-4EC4-473A6F2468A1> (7.8.2010)
90. Hendrickson, T.L., de Crecy-Lagard, V., Schimmel, P.: *Annu. Rev. Biochem.*, 73, 147-176 (2004)
91. Kiick, K.L., Weberskirch, R., Tirrell, D.A.: *FEBS Lett.*, 502, 25-30 (2001)
92. Link, A.J., Mock, M.L., Tirrell, D.A.: *Curr. Opin. Biotechnol.*, 14, 603-609 (2003)

93. Rennert, O.M., Anker, H.S.: *Biochemistry*, 13, 471-476 (1963)
94. Suchanek, M., Radzikowska, A., Thiele, C.: *Nat. Methods*, 2, 261-267 (2005)
95. Wiechelman, K. J., Braun, R. D., Fitzpatrick, J. D.: *Anal. Biochem.*, 175, 231-237 (1988)
96. Estabrook, R. W., Werringloer, J.: *Methods Enzymol.*, 52, 212-220 (1978)
97. <http://www.expasy.ch/cgi-bin/protparam1?P00169@2-134@> (2.7.2010)
98. Mulrooney S.B., Waskell L.: *Protein Expr. Purif.*, 19, 173-178 (2000)
99. Jung, Y., Kwak, J., Lee, Y.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 55, 187-191 (2001)
100. Funk, W.D., Lo, T.P., Mauk, M.R., Brayer, G.D., MacGillivray, R.T.A, Mauk, A.G.: *Biochemistry*, 29, 5500-5508 (1990)
101. Woodard, S.I., Daily, H.A.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 316, 110-115 (1995)

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

Jméno a příjmení s adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka